

ЛАБОРАТОРИЯ РАДИАЦИОННОЙ БИОЛОГИИ

В 2009 г. в лаборатории проводились исследования в соответствии с темой первой категории Проблемно-тематического плана научно-исследовательских работ и международного научно-технического сотрудничества ОИЯИ 04-9-1077-2009/2011 «Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц различных энергий» по следующим основным направлениям: фундаментальные радиобиологические и радиационно-генетические исследования с тяжелыми заряженными частицами, исследования влияния ускоренных

заряженных частиц на структуры глаза (хрусталик и сетчатку); молекулярно-динамические исследования; математическое моделирование индуцированного мутагенеза в бактериальных клетках; радиационные исследования и радиационная защита от излучений базовых установок ОИЯИ и окружающей среды. Большое внимание уделялось участию молодых исследователей, студентов и аспирантов в текущей работе лаборатории, а также в конференциях и семинарах, проводимых с участием ЛРБ.

РАДИАЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА И РАДИОБИОЛОГИЯ

Радиационная генетика низших эукариот. В 2009 г. продолжены исследования закономерностей мутационного процесса у дрожжей-сахаромицетов. Изучали закономерности возникновения спонтанных и индуцированных электромагнитным излучением (УФ-свет) и ионизирующей радиацией (гамма-лучи) мутационных событий в зависимости от функциональности чекпойнт-контроля и активности функционирования митохондрий. В работе использовали генетические системы для тестирования рекомбинации (межхромосомной и внутрехромосомной, в том числе сопровождающейся возникновением делеций), делеций и мутаций сдвига рамки считывания. Для подавления чекпойнт-контроля использовали мутанты киназы *rad53*, участвующей в активации многочисленных путей чекпойнт-контроля. Эксперименты показали, что мутация *rad53* подавляет делеционный мутагенез, а ген *RAD53* участвует в NHEJ-пути репарации, сопровождающейся возникновением делеций. Кроме того, анализировали влияние функциональности митохондрий на уровень мутагенеза. В экспериментах активность дыхания в митохондриях подавляли с помо-

щью мутаций дыхательной недостаточности ρ^0 и ρ^0 . Было показано, что нарушение дыхания влияет на выживаемость, рекомбинацию и на возникновение делеций. Влияния на возникновение *frame shift* мутаций не было обнаружено.

Начато изучение участия мутаций, локализованных в генах, кодирующих субъединицы белковых комплексов, таких как киназа CDC28, гистонацетилтрансфераза SAGA и регулятор локализации деацетилазы Sir2, в апоптозе и старении клеток. Ранее нами было показано участие этих генов в репарации и чекпойнт-контроле [5, 7].

Киназа CDC28 играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла. Изучение плеiotропных проявлений полученной нами мутации *cdc28-srm* [Gly20Ser] и мутации *cdc28-13* [Arg283Gln] актуально, поскольку в клетках человека нарушения функционирования гомологичной киназы приводят к злокачественному перерождению клеток.

Использование динамического моделирования позволило определить структурные изменения, вызванные соответствующими мутациями в гомологичной киназе человека CDK2. Мутация *cdc28-srm*

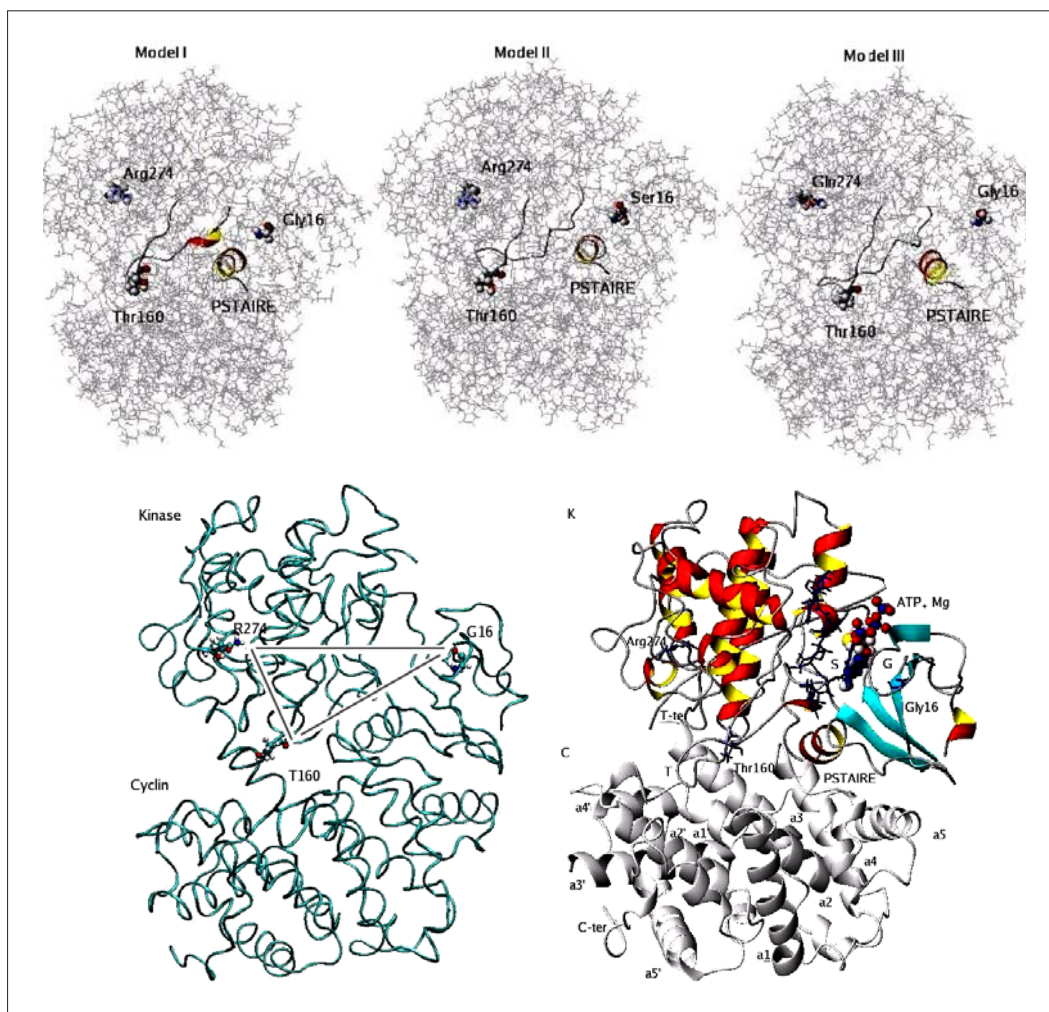


Рис. 1. Модель киназы CDK2 и циклина А. Указаны позиции исследуемых аминокислотных остатков G16 в G-петле малого домена, R274 в большом домене и T160 в Т-петле большого домена киназы

представляет собой замену третьего глицина в консервативной последовательности GxGxxG в так называемой G-богатой петле в малом кулачке киназной субъединицы и располагается напротив Т-петли в большом кулаке киназной субъединицы. Несмотря на установленную важность, роль G- и Т-петель изучена недостаточно. В настоящее время для исследования структуры киназ, в том числе и CDC28, используют кристаллическую структуру киназы человека CDK2. В работе анализируется наносекундная динамика движения комплекса CDK2/ATP [6]. МД-моделирование мутантных структур киназы с заменами аминокислот CDK2-G16S в G-богатой петле малого кулачка и CDK2-R284Q в большом кулаке показало важность этих аминокислот и их влияние на конформацию киназы CDK2, проявляющуюся в возрастании расстояния между G- и Т-петлями у соответствующих мутантных форм. Полученные результаты показывают, что мутации дестабилизируют локальную структуру в области Т-петли (рис. 1). Мутация Arg284 → Gln284 в удаленной С-концевой области имеет более выраженный

эффект и приводит к разрыхлению структуры киназы и увеличению расстояния между G- и Т-петлями. Исследования третичной структуры нативного и мутантного белков чрезвычайно перспективно в свете разработки лекарств.

Радиационная цитогенетика. Продолжены исследования индивидуальной вариабельности радиочувствительности хромосомного аппарата клеток при воздействии излучений с высокими ЛПЭ. В ходе экспериментов проанализированы хромосомные aberrации в лимфоцитах крови человека, облученных в G0- и G2-фазах клеточного цикла. Облучение проводили γ -лучами (4 донора), протонами (7 доноров), ионами ^{12}C (9 доноров), ионами ^7Li (2 донора), ионами ^{11}B (3 донора) и ионами ^{20}Ne (4 донора). Энергии пучков ионов и значения ЛПЭ составили: протоны — 170 МэВ/нуклон и ЛПЭ $\approx 0,5$ кэВ/мкм; ^{12}C — 480 МэВ/нуклон и ЛПЭ $\approx 10,6$ кэВ/мкм; ^7Li — 30 МэВ/нуклон и ЛПЭ ≈ 20 кэВ/мкм; ^{11}B — 32 МэВ/нуклон и ЛПЭ ≈ 55 кэВ/мкм; ^{20}Ne — 53 МэВ/нуклон и ЛПЭ ≈ 170 кэВ/мкм. Анализ хромосомных aberrа-

ций, индуцированных в G0- и G2-фазах клеточного цикла, проводили как стандартным метафазным методом (в нормальных митотических клетках), так и методом РСС (преждевременная конденсация хромосом, вызванная *calyculin A*).

В ходе исследования выявлены существенные различия в радиочувствительности образцов крови доноров, облученных в G0- и G2-фазах клеточного цикла. В целом результаты показывают более высокую вариабельность между образцами крови доноров по частоте хромосомных aberrаций для ускоренных заряженных частиц, чем для γ -лучей. Были замечены отличия относительно уровня радиочувствительности при анализе обычным метафазным методом и РСС. Для сравнения вариабельности выхода aberrаций, индуцированных излучениями разных типов, был вычислен коэффициент вариабельности для хромосомных и хроматидных aberrаций. Вариабельность уровня aberrаций, индуцированных у разных доноров в фазе G2, в среднем выше, чем в G0 [8].

Фингерпринт-оценка частот F (отношение дицентриков к кольцам) и C (отношение комплексных aberrаций к простым aberrациям) выявила различие между донорами по данным показателям при использовании различных методик цитогенетического анализа. Обнаружена дозовая зависимость фактора F для гамма-излучения; в то же время для заряженных частиц не наблюдается его зависимость от дозы и времени фиксации. При анализе методом РСС + FISH была показана четкая корреляция факторов F и C с ЛПЭ. Установлено, что между донорами выше вариабельность фактора C, чем фактора F. Эти результаты хорошо объясняют различия в данных, полученных в других лабораториях мира, и подтверждают важность анализа методом РСС + FISH при оценке качества излучения для биологической дозиметрии [9].

В 2009 г. работа по анализу хромосомных нарушений в лимфоцитах крови человека, облученных

протонами терапевтического пучка фазотрона ОИЯИ в разных фазах клеточного цикла, удостоена второй премии за научно-технические прикладные работы на XIII научной конференции Объединения молодых ученых и специалистов ОИЯИ «ОМУС-2009».

Морфологическим методом с использованием флуоресцентного окрашивания препаратов смесью красителей (акридинового оранжевого и бромистого этидия) исследованы закономерности индукции апоптоза γ -квантами ^{60}Co в лимфоцитах крови человека в различные сроки после облучения — 0, 24, 48 и 72 ч. Выявлена вариабельность результатов для доноров различных возрастных категорий — от 21 до 62 лет [1, 2].

Изучены закономерности индукции апоптоза в лимфоцитах человека на различных стадиях клеточного цикла после облучения γ -квантами и протонами в пике Брэгга (рис. 2). Показано, что наиболее чувствительны по этому критерию клетки, находящиеся на G2- и S-стадиях клеточного цикла [3].

Изучено модифицирующее влияние ингибиторов репликативного и репаративного синтеза ДНК — арабинозидцитозина и гидроксимочевины на кинетику γ -индуцированного апоптоза в лимфоцитах человека. Показано, что в присутствии ингибиторов возрастает частота индуцированного апоптоза, что коррелирует с активным накоплением в этих условиях энзиматических двунитевых разрывов ДНК, которые, как известно, служат молекулярной основой событий, приводящих к запуску апоптоза (рис. 3).

Исследовано влияние комбинированного действия γ -излучения и липида А, выделенного из *Escherichia coli*, на фагоцитарную, лизоцимную и пероксидазную активность лейкоцитов крови человека. Установлено, что липид А в низкой концентрации оказывает существенное влияние на клетки человека при γ -облучении, повышая их фагоцитарную и лизоцимную активность. Кроме того, липид А при низких дозах облучения снижает пероксидазную актив-

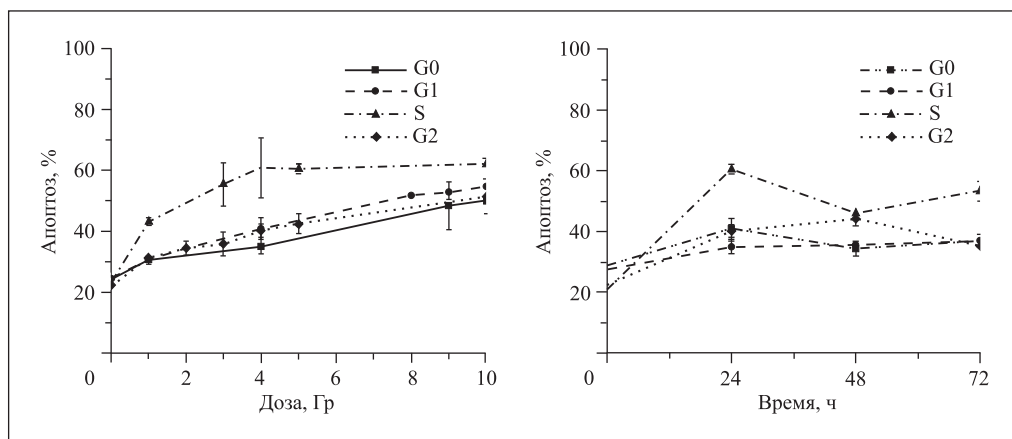


Рис. 2. Индукция (слева) и кинетика (справа) апоптоза в лимфоцитах человека в различных фазах клеточного цикла

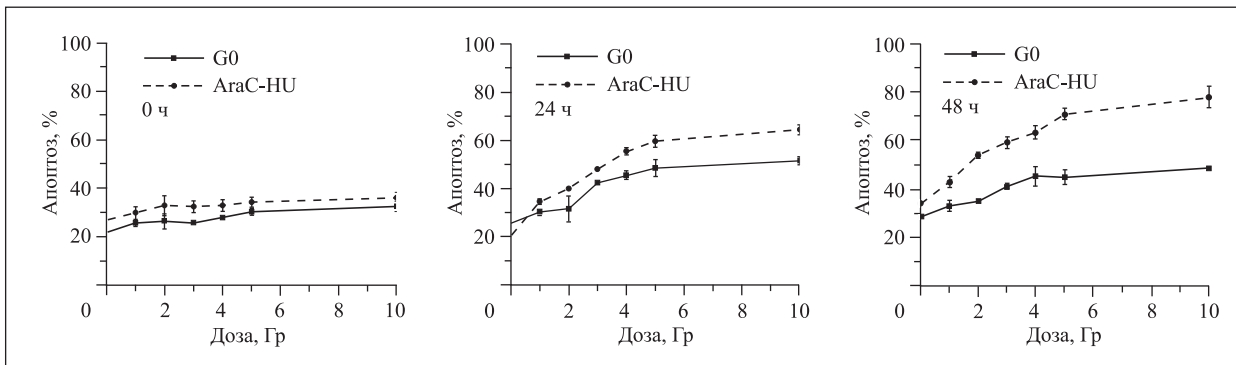


Рис. 3. Индукция апоптоза после γ -облучения лимфоцитов человека в условиях влияния ингибиторов репликативного и репаративного синтеза ДНК сразу после облучения (слева), через сутки (в середине) и через двое суток (справа)

ность. На основании полученных результатов сделан вывод о том, что при действии ионизирующей радиации липид А оказывает модифицирующее влияние на фагоцитарные, лизоцимные и пероксидазные свойства клеток, формирующих иммунный ответ [4]. На рис. 4 показана относительная иммунная активность лейкоцитов человека после облучения γ -квантами ^{60}Co .

С учетом выполненных работ запланированы дальнейшие генетические исследования с тяжелыми заряженными частицами высоких энергий, что позволит решить многие практические вопросы, стоящие перед космической радиобиологией, радиационной генетикой и медициной.

Ранее было показано, что в области малых доз γ -излучения зависимость числа aberrантных клеток от дозы имеет сложный нелинейный характер. Она характеризуется областью аномально высокой радиочувствительности при дозах менее 5–7 сГр, которая предшествует области повышенной радиорезистентности (ПРР) при более высоких дозах. Природа этого явления неизвестна. Предполагается, что наблюдаемая гиперчувствительность (ГЧ) является следствием радиационно-индуцированного возрастания продукции активных форм кислорода (АФК) в

митохондриальной цепи переноса электронов в результате так называемого перехода митохондриальной проницаемости (ПМП). С другой стороны, амплификация АФК является весьма эффективным регулятором функционирования клеточных цитопротекторных путей, в том числе направленных на подавление радиационно-индуцированного окислительного стресса. Исходя из имеющихся литературных данных мы предположили, что наиболее вероятным кандидатом на роль основного белка-протектора является ERK протеин-киназа. Для проверки сформулированной нами гипотезы о роли АФК и ERK протеин-киназы в явлении ГЧ/ПРР были использованы различные модификаторы.

Клетки карциномы молочной железы человека *cal51* облучали дозами 1–20 сГр γ -лучей в присутствии диметилсульфоксида (DMSO)-перехватчика АФК, циклоспорина А (CsA) — ингибитора ПМП, PD98059 — ингибитора ERK и TPA-активатора ERK. После 8-часового инкубирования производили подсчет числа aberrантных анафаз. Результаты представлены на рис. 5.

DMSO предотвращает как ГЧ, так и ПРР, в результате чего форма кривой доза–эффект приближается к линейной. Эффект CsA еще более ярко выра-

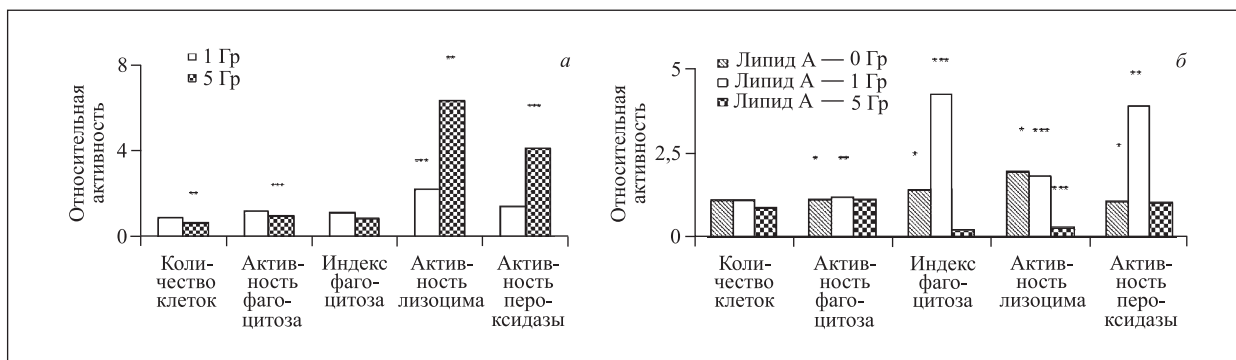


Рис. 4. Модифицирующее влияние липида А на иммунную активность лейкоцитов человека, облученных γ -квантами ^{60}Co (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$)

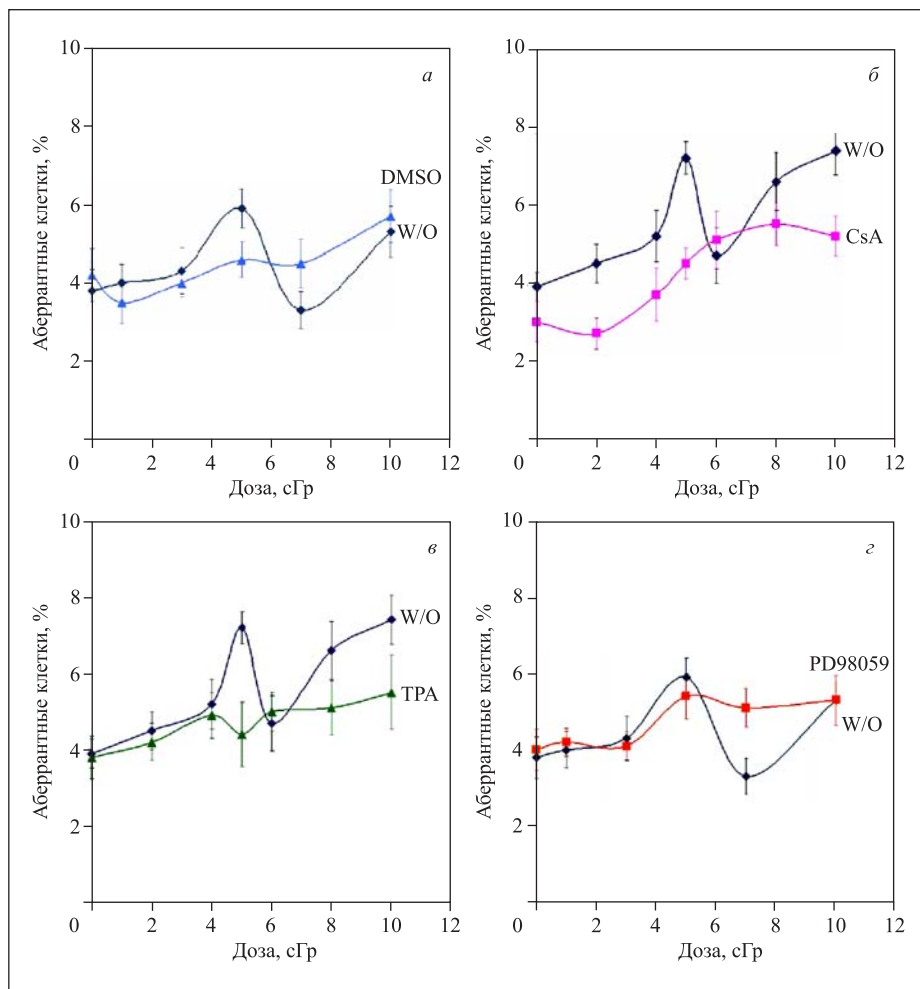


Рис. 5. Эффект модификаторов на частоту аберрантных клеток, индуцированных малыми дозами γ -излучения в клетках карциномы молочной железы cal51

жен: до 4 сГр число аберрантных клеток практически остается на уровне контрольных показателей. Заметное снижение числа аберраций имеет место в присутствии активатора ERK, особенно значительное в области доз, соответствующей пику ГЧ для необработанных модификатором клеток. Обратная картина наблюдается в случае ингибитора ERK: клетки, обработанные PD98059, теряют PPP, свойственную данной линии клеток при дозах 5–10 сГр.

Эти данные четко указывают, что именно активные формы кислорода являются фактором, обуславливающим гиперчувствительность в области малых доз γ -излучения. Как показывают эксперименты с обработкой клеток ингибитором ПМП (CsA), эти АФК имеют митохондриальное происхождение. Активация ERK необходима для защиты клеток от оксидативных повреждений, вызываемых АФК.

Помимо указанных исследований, направленных на выяснение механизмов, лежащих в основе явления гиперчувствительности/повышенной радиорезистентности, были продолжены работы по изучению адаптивного ответа на клетках лимфоцитов человека.

Адаптивный ответ — феномен, проявляющийся в снижении чувствительности клеток к большой дозе радиации, если предварительно они были подвергнуты воздействию малой дозы такого же или иного типа радиации. Было сделано предположение, что адаптивный ответ является следствием повышенной радиорезистентности в результате индукции цитопротекторных механизмов. Однако, как показали наши исследования, четкой корреляции между этими явлениями обнаружено не было, возможно, вследствие высокой интердонорной и интрадонорной вариативности.

Математическое моделирование радиационно-индуцированных эффектов. Разработаны новые математические подходы к моделированию мутационного процесса, индуцированного ультрафиолетовым (УФ) излучением в бактериальных клетках *Escherichia coli*. Построена модель, описывающая индуцированный мутационный процесс посредством детального математического описания ключевых белковых взаимодействий в ходе SOS-ответа бактерий *E. coli*. Впервые показана связь между про-

цессами, происходящими во время работы системы SOS-ответа, и эффективностью реализации процесса translesion-синтеза (TLS), подробно проанализирована вся цепочка событий от момента воздействия повреждающего фактора на клетку до возникновения мутации в цепи ДНК. Получены численные решения уравнений модели для каждого белка SOS-системы.

Построена математическая модель translesion-синтеза в бактериальных клетках *E. coli*. Выполнена количественная оценка вероятности возникновения определенного числа ошибок в ходе реализации процесса TLS. На основании разработанных модельных представлений проведена количественная оценка выхода генных мутаций при УФ-облучении. На примере регуляторного гена *lacI* *E. coli* рассчитана зависимость частоты мутаций от дозы УФ-излучения. При определенных значениях свободных параметров модели выявлено совпадение результатов моделирования с экспериментальными данными [10–12].

Разработана математическая модель, описывающая динамику индуцирующего сигнала SOS-системы в бактериальных клетках *E. coli* при действии ускоренных ионов. С использованием построенной ранее модели [13] количественно описан процесс образования основных премутационных повреждений ДНК: повреждений оснований (ПО), односторонних разрывов (ОР), двусторонних разрывов (ДР) и кластерных повреждений (КП). В использованной модели ДНК рассматривается в виде линейной мишени, случайным образом ориентированной относительно трека заряженной частицы. В модели учтен характер радиального распределения энергии в треках частиц, что весьма важно для оценки роли δ -электронов в радиобиологических эффектах излучений с разной ЛПЭ.

На рис. 6 представлен сравнительный расчет выхода ПО, ОР, ДР и КП в зависимости от ЛПЭ ионов различных типов. Полученные результаты подтверждают, что характер зависимости выхода ПО от ЛПЭ аналогичен зависимости ОР ДНК от ЛПЭ, при этом выход ПО ДНК в 4 раза больше выхода ОР на всем рассчитанном диапазоне ЛПЭ, что связано с эффективным увеличением толщины линейной мишени ДНК. Зависимость выхода ДР и КП ДНК описывается кривой с максимумом, после достижения которого дальнейшее увеличение ЛПЭ становится неэффективным. Проведено сравнение результатов расчетов, описывающих общий выход КП (независимо от их типа), с экспериментальными данными [13], характеризующими зависимость величины SOSIP, оцененной с помощью метода SOS-хроматеста, от ЛПЭ излучений. Выявлено совпадение результатов расчетов с экспериментальными данными.

Построены модели основных типов репарации, ведущих к формированию индуцирующего сигнала для SOS-системы, которым является наличие в клетке участков односторонней ДНК. В рамках исследования смоделированы следующие типы репарации: репарация односторонних разрывов с участием

ДНК-полимеразы I, репарация двусторонних разрывов путем гомологичной рекомбинации, восстановление модифицированных оснований путем эксцизионной репарации, репарация кластерных повреждений посредством реализации SOS-ответа. При моделировании учтены процессы перехода кластерных повреждений в двусторонние разрывы, а также трансформация двусторонних разрывов в односторонние с образованием временного или постоянного гетеродуплекса.

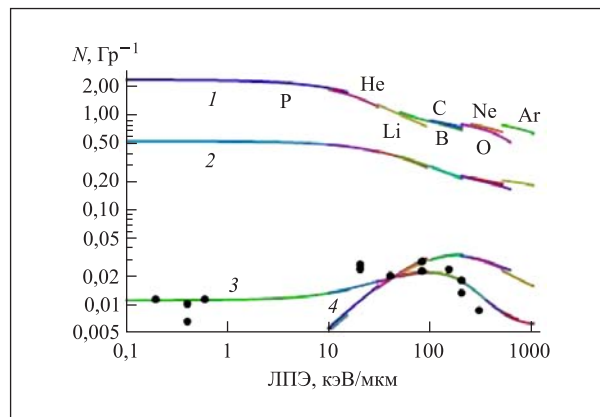


Рис. 6. Выход на 1 геном повреждений оснований (1), односторонних разрывов ДНК (2), кластерных повреждений (3) и двусторонних разрывов ДНК (4) в зависимости от ЛПЭ частиц с энергией 3–10 МэВ/нуклон. Точки — экспериментальные данные зависимости величины SOSIP от ЛПЭ излучений [13]

Получены результаты, характеризующие динамику концентрации индуцирующего сигнала при воздействии ионов различных типов в клетках *E. coli* дикого типа и в *umuDC*-мутантах.

Разработана стохастическая модель SOS-ответа, основанная на использовании алгоритма Гиллеспи, получившего широкое распространение при моделировании сложных биологических систем. Преимуществами данного подхода являются корректное описание кинетики основных белковых взаимодействий, реализуемых в ходе SOS-ответа в отдельно взятой бактериальной клетке при малых флюенсах энергии УФ (< 1 Дж/м²), а также возможность количественно оценить выживаемость клеток при действии УФ-излучения. Предложенная модель позволяет описывать кинетику SOS-ответа в бактериальных клетках *E. coli* при произвольном значении флюенса энергии УФ-излучения и в перспективе может быть обобщена на случаи других повреждающих внешних воздействий. В ходе данной работы была рассчитана динамика формирования первичных и вторичных повреждений ДНК, основных белковых комплексов SOS-системы в отдельно взятой клетке, а также выживаемость популяции клеток. Выявлены значительные флуктуации уровня концентрации белков SOS-системы при малом числе молекул для димеризованных продуктов гена *umuD*.

Катаракта — помутнение хрусталика — одна из основных причин ухудшения зрения. Возникновение и развитие катаракты является заболеванием, сопровождающим процесс старения, более того, оно может служить маркером старения организма. Множество факторов внутреннего и внешнего происхождения ускоряют развитие катаракты. Например, повышение сахара в крови способствует развитию диабетической катаракты, а воздействие ультрафиолетом вызывает образование ультрафиолетовой катаракты. Уже более 50 лет существует гипотеза, согласно которой радиация ускоряет процесс старения. С этой точки зрения радиационная катаракта может рассматриваться как старческая. Помутнения при радиационной катаракте имеют локальный характер. Однако в последние годы появились сведения, что радиационная катаракта у космонавтов имеет диффузный характер. В связи с этим предполагается, что причиной этого может быть специфика галактического излучения, которое содержит высокоэнергетические тяжелые частицы (ВЭТЧ). ВЭТЧ повреждают белки хрусталика — кристаллины, вызывая образование в молекуле внутренних разрывов. На Земле хрусталик подвергается воздействию ультрафиолетового излучения. Добавочное облучение УФ выявляет такие «ослабленные» молекулы, белок денатурирует и агрегирует. Это нарушает ближний порядок упаковки молекул, возникают локальные изменения концентрации белка, и, как следствие, локально изменяется коэффициент преломления среды, светорассеяние увеличивается и возникает помутнение.

Для проверки гипотезы были проведены две серии экспериментов: *in vitro* исследование влияния облучения ВЭТЧ растворов кристаллинов с целью выявления изменений их стабильности и *in vivo* по индукции катаракты ионизирующим излучением в комбинации с ультрафиолетом.

Исследование изменений стабильности растворов кристаллинов под влиянием облучения ВЭТЧ в условиях *in vitro*. Растворы α - и β_L -кристаллинов хрусталика глаза быка, полученные с помощью гель-фильтрации, подвергали бомбардировке ядрами ^{11}B , ^{12}C и Li . После чего изучали структурно-функциональные изменения белков. Была исследована стабильность β_L -кристаллина по отношению к тепловой и фотоиндуцированной денатурации, а также шаперонная активность α -кристаллина по отношению к тепловой и фотоиндуцированной денатурации β_L -кристаллина. Структурные изменения в белках охарактеризованы с помощью исследования триптофановой и нетриптофановой флуоресценции, методами гель-фильтрации и электрофореза в ПААГ в денатурирующих и восстанавливающих условиях. Облучение ядрами ^{11}B (32 МэВ) не вызвало явных

изменений в устойчивости β_L -кристаллина к тепловой денатурации, тогда как доза 8 Гр привела к 30%-му сокращению лаг-периода процесса фотоагрегации под действием УФ-света (ДРШ 1000, УФС-2, 37 °С). При этом данные электрофореза не показали изменений в полипептидном составе образцов при действии облучения. Исследование спектров флуоресценции свидетельствует о некоторых конформационных перестройках в молекуле β_L -кристаллина, возникающих уже при облучении в дозе 4 Гр.

Исследование α -кристаллина показало, что облучение ядрами ^{11}B не вызывает значимых изменений ни размера, ни формы молекулы (гель-фильтрация, рентгеновское малоугловое рассеяние); также не обнаружено и образования сшивок между субъединицами белка (электрофорез в ПААГ). Изменений шаперонной активности по отношению к тепловой денатурации β_L -кристаллина также не обнаружено, однако по отношению к фотоагрегации замечено некоторое снижение шаперонной активности белка. Облучение ядрами ^{12}C (500 МэВ) α - и β_L -кристаллина проводилось дважды, однако значимых изменений обнаружено не было. Облучение ядрами Li не повлияло на устойчивость β_L -кристаллина к тепловой денатурации. Исследование устойчивости белка к фотоагрегации под действием УФ-света (ДРШ 1000, УФС-2, 37 °С) показало, что облучение сокращает лаг-фазу и увеличивает скорость агрегации. Однако дозовая зависимость оказалась существенно нелинейна — максимальный эффект ускорения фотоагрегации получен при дозе 4 Гр, тогда как доза 16 Гр не отличалась от контроля. Данные электрофореза также не показали изменений в полипептидном составе образцов при действии облучения. Исследование спектров флуоресценции показало, что явных изменений в спектре молекул нет. Исследование α -кристаллина показало, что облучение не вызывает значимых изменений размера молекулы (гель-фильтрация), также не обнаружено и образования сшивок между субъединицами белка (электрофореза в ПААГ). Изменений шаперонной активности по отношению к тепловой денатурации β_L -кристаллина не обнаружено. Однако по отношению к фотоагрегации, как и в случае облучения ядрами ^{11}B , замечено некоторое снижение шаперонной активности белка.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что высокоэнергетические ядра (500 МэВ) при мощности дозы 4 Гр/ч не оказывают воздействия на кристаллины, тогда как ядра с энергией около 40 МэВ при мощности дозы 4 Гр/мин способны повреждать молекулы как β_L -, так и α -кристаллина. Однако полученные результаты достаточно противоречивы и требуют дальнейших исследований.

Исследование индукции катаракты при действии γ -квантов в комбинации с ультрафиолетовым излучением. Четыре рандомизированные группы мышей-самцов F1 (C57Black/CBA) подвергали ежедневному облучению УФ (280–380 нм, 15 мин, $5,5 + 0,8$ Вт/м²), однократному облучению γ -квантами в дозе 2 Гр всего тела животного и комбинации этих факторов (γ -кванты + УФ). Группа №4 служила контролем возрастных изменений (К). Развитие катаракты на 7-й и 10-й месяц оценивали методом экспертных оценок с использованием 6-бальной шкалы. На 7-й месяц степень помутнения хрусталиков равнялась следующим значениям: К = 0,0, УФ = $2,50 \pm 0,13$; γ -кванты = $1,00 \pm 0,28$; γ -кванты + УФ = $4,00 \pm 0,45$ (медиана $\pm \sigma$, различия достоверны ($p < 0,001$, U-тест Манна-Уитни) между всеми группами. На 10-й месяц степень помутнения хрусталиков существенно возросла: К = $2,75 \pm 0,17$; УФ = $5,75 \pm 0,42$; γ -кванты = $6,00 \pm 0,29$; γ -кванты + УФ = $7,00 \pm 0,38$ (медиана $\pm \sigma$, различия между группами также достоверны ($p < 0,01$, U-тест Манна-Уитни), за исключением пары «УФ– γ -кванты» ($p = 0,69$). На 10-й месяц исследовали морфологию хрусталика и изменения его белкового состава. Таким образом, во всех экспериментальных группах обнаруживаются морфологические изменения хрусталика, однако каких-либо специфических изменений для данных групп обнаружить не удалось. Хотя ранее и было показано, что радиационная катаракта сопровождается образованием преимущественно заднекортикальных помутнений, более поздние исследования показали, что наиболее частой является диффузная катаракта.

Для исследования гистологических изменений в хрусталике использовали полутонкие срезы, а также препарат распластанного эпителия. Микроскопию эпителия проводили с помощью микроскопа Technival (Carl Zeiss Jena), снабженного цифровой фотокамерой (Nikon CoolPix P5000). Следует отметить, что были исследованы кортикальные области хрусталика, т.е. именно те области, в которых в основном и обнаруживались помутнения. При этом оценивали общее строение ткани, митотический индекс, а также наличие следующих патологических изменений: появление ядер с вакуолями и макроядер, пустоты в эпителиальном пласте, появление многослойных структур, образованных перерожденными эпителиальными клетками, наличие десквмированных клеток, появление клеток с вакуолями в цитоплазме. Исследование состояния эпителия хрусталика также показало единый для всех воздействий эффект — снижение плотности клеток. Это согласуется с данными о том, что и радиация, и ультрафиолет, и старение снижают плотность клеток эпителия хрусталика. Таким образом, при исследовании микроскопических препаратов были обнаружены неспецифические изменения, связанные со старением животных, которые усиливались в ряду К, УФ,

γ -кванты, γ -кванты + УФ. Следует подчеркнуть, что точно так же возрастала и степень помутнения хрусталика.

Для исследования изменений протеома хрусталика применяли метод разностного электрофореза. В качестве образцов были использованы хрусталики глаз животных, катаракта которых соответствовала медиане группы, а степень помутнения правого и левого хрусталиков оценивалась одинаково. Для анализа использовали следующие пары образцов: «К– γ -лучи»; «К–УФ»; «К– γ -кванты + УФ»; « γ -кванты–УФ»; « γ -кванты– γ -кванты + УФ»; при этом один из образцов пары был окрашен флуоресцентным красителем Су-3 ($\lambda_{ex/em} = 532/580$), а другой Су-5 ($\lambda_{ex/em} = 633/680$). После разделения на оборудовании для двумерного электрофореза (BioRad, США) образцы гель-сканировали с помощью лазерного сканера Typhoon 9410 (GE Healthcare). На изображении геля белки, представленные в обоих образцах пары, окрашены в желтый, а различающиеся в зеленый (Су-3) или красный (Су-5) цвета. Изображения анализировали с помощью программы DeCyder (GE Healthcare). Все пятна на электрофореграммах смесей «К– γ -кванты», «К–УФ», «К– γ -кванты + УФ», « γ -кванты–УФ», « γ -кванты– γ -кванты + УФ» как водорастворимой, так и водонерастворимой фракции белков оказались окрашены в желтый цвет. Согласно принципу метода разностного электрофореза это означает, что данные пары образцов не отличаются по составу белков. Таким образом, длительное воздействие небольших доз УФ, облучение γ -квантами в дозе 2 Гр и их комбинированное воздействие не влияют на белковый состав как растворимой, так и нерастворимой фракции хрусталика глаза мыши.

Исследования изменений белкового состава хрусталика, возникающих при старении организма и/или образовании катаракты, отчетливо показали образование посттрансляционных модификаций белковых молекул. При этом ожидалось, что воздействие ультрафиолета в диапазоне 280–390 нм должно оказать более существенное повреждающее действие. Однако, как показал интегральный метод разностного электрофореза, сколько-нибудь существенной разницы между старением, действием ультрафиолета и радиации не обнаруживается. Это может быть обусловлено или, действительно, отсутствием различий, или более низкой по сравнению с окраской серебром чувствительностью флуоресцентных красителей.

В литературе уже неоднократно высказывалась идея о том, что ионизирующее излучение или облучение УФ может служить инструментом для моделирования процесса образования старческой катаракты, но высказывались и противоположные утверждения. В настоящем исследовании впервые проведено комплексное изучение формирования катаракты с использованием рандомизированных экспериментальных групп.

Таким образом, результаты этого сравнительного исследования указывают на то, что процесс старения, облучение УФ и/или γ -квантами вызывает не-

отличимые изменения в хрусталике на всех уровнях его организации: молекулярном, клеточном и органном [14, 15].

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОФИЗИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Научно-исследовательские задачи заключаются в проведении молекулярно-динамического (МД) моделирования физических наносистем и биологических объектов с использованием современных высокопроизводительных методов расчета и вычислительных кластеров. Исследования по молекулярной динамике выполняются в тесной коллаборации с ведущими исследовательскими центрами Японии (RIKEN, Центр наук о геноме RIKEN-Иокогама, Университет Кейо) и Англии (Лаборатория Дарсберри) [16].

МД-моделирование является одним из эффективных методов в изучении свойств наносистем и биологических (белковых) макромолекул. Поиск релаксированных конформационных состояний для мутантных белков на базе традиционных вычислительных подходов может занимать годы даже для одной белковой структуры. В современной вычислительной химии и нанобиотехнологических исследованиях разработаны и внедрены эффективные алгоритмы и разнообразные методы МД — от традиционного классического до гибридных, например, классический в сочетании с квантовой химией, — позволяющие с высокой точностью воспроизвести свойства молекулярных систем, предсказать их нетривиальную динамику или новые явления.

В работе [6] проведен сравнительный МД-анализ 3D-структур для различных аллельных форм протеинкиназы человека CDK2. Смоделирована кристаллическая структура комплекса протеинкиназы человека CDK2/циклин А. МД-моделирование выполня-

лись для нативной структуры и ее мутантной аллели, где произведено точечное аминокислотное замещение глицина на серин в позиции 16 (G16S) в консервативной G-петле. Показано, что указанное замещение вызывает серьезную модификацию белковой структуры. По высокой гомологии с дрожжевой протеинкиназой CDC28 подобные изменения могут иметь серьезные плейотропические биологические эффекты. С целью изучения важности наблюдаемых модификаций структур нами исследовалась другая мутантная аллельная форма R274Q, которая для дрожжевой киназы не имеет биологического эффекта при разрешенных температурах. Сравнение и анализ полученных структур CDK2 для трех аллелей показывают, что среднеквадратичные отклонения атомов киназа + циклин для нативной и мутантной аллелей R274Q одинаковые; в то же время структуры T- и G-петель модифицируются. Результаты МД-расчетов коррелируются с наблюдаемыми в эксперименте биологическими эффектами по киназной структуре (рис. 7).

В работе [17] выполнено МД-моделирование зрительного пигмента родопсина с точечной мутацией E181K, связанной с патогенезом пигментного ретинита (коллаборация ОИЯИ — Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН). Одной из причин возникновения пигментного ретинита, вызывающего гибель фоторецепторных клеток и дегенерацию сетчатки, являются мутации гена родопсина RP4(RHO)/Rhodopsin(3q). Синтез мутантной формы белка приводит к нарушению формирования натив-

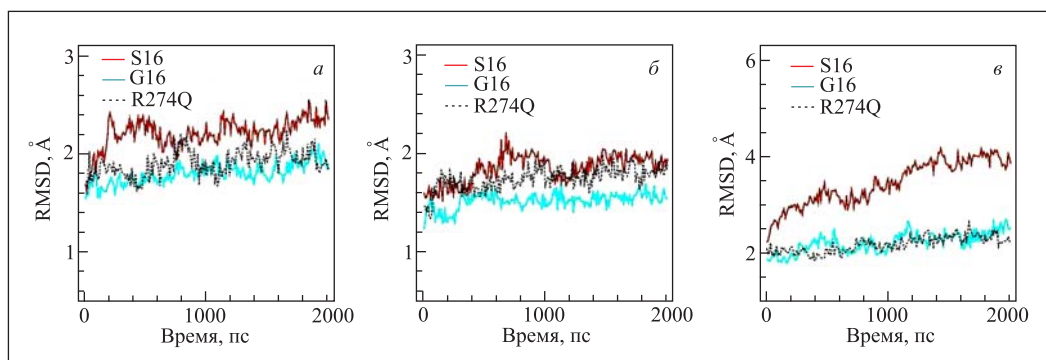


Рис. 7. Временные зависимости среднеквадратичных отклонений (RMSD) атомов для различных форм CDK2 — нативной (G16 R274) и мутантных (G16S и R274Q): *a* — киназа; *б* — циклин; *в* — киназа + циклин

ного зрительного пигмента, что влечет за собой иницирование патологических процессов в фоторецепторной клетке. Целью данной работы было исследование молекулярного механизма нарушения процесса встраивания 11-*цис*-ретинала в хромофорный центр белка с точечной мутацией E181K при формировании молекулы зрительного пигмента. Анализ взаимного расположения аминокислотных остатков в хромофорном центре родопсина и их взаимодействие с хромофором, 11-*цис*-ретиналом, был проведен с помощью метода компьютерного молекулярного моделирования. Проанализировано три модельных состояния родопсина: 1) нативная форма родопсина с 11-*цис*-ретиналом; 2) нативная форма опсина (без 11-*цис*-ретинала); 3) мутантная форма родопсина E181K, где глутамат-181 замещен на лизин (с 11-*цис*-ретиналом). Показано, что в мутантной форме родопсина E181K не происходит нормального встраивания 11-*цис*-ретинала как хромофора в хромофорный центр опсина. Это приводит к нарушению конформационного состояния молекулы как в хромофорном центре, так и в ее цитоплазматической части. В результате этого не происходит формирования устойчивой ковалентной связи 11-*цис*-ретинала с белком, а также не блокируется полностью активный центр связывания родопсина с трансдуцином. На основе полученных данных сделан вывод, что наиболее результативным лечением пигментного ретинита, вызванного мутацией гена родопсина, как нам кажется, мог бы быть подход с применением методов генной инженерии, способных полностью заменить генетический материал в патологических клетках.

ФИЗИКА ЗАЩИТЫ И РАДИАЦИОННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Продолжались работы по оценке радиационной обстановки на проектируемом ускорительном комплексе NICA при различных вариантах компоновки защит элементов комплекса [19]. Моделировались функции источников излучения, в частности, на рис. 8 показаны результаты расчетов по программе GEANT4 двойных дифференциальных выходов нейтронов при взаимодействии ядер урана различной энергии с толстой мишенью из различных материалов. Начата работа по моделированию динамики накопления наведенной активности на элементах оборудования колец нуклотрона и коллайдера и активации воздуха внутри каналов.

Продолжались работы по программе исследования ядерно-физическими методами поверхностей планет совместно с Институтом космических исследований и ЛНФ. Завершена программа по нейтронному детектору LEND в составе аппарата, запущенного на орбиту Луны летом 2009 г. Большая работа выполнена в связи с разработкой, те-

В работе [18] проведен анализ по определению предельного парциального молярного объема раствора монокарбоксильных кислот в бензоле методом МД-моделирования (коллаборация ОИЯИ–Киевский государственный университет им. Тараса Шевченко, Украина). Термодинамические свойства растворов ненасыщенных жирных кислот в неполярных органических растворителях представляют большой интерес, поскольку эти растворы являются основой для перспективного синтеза высокодисперсных магнетитосодержащих жидкофазных систем. Так, олеиновая кислота — классический поверхностно-активный стабилизирующий агент, используемый при синтезе феррожидкостей для покрытия магнитных наночастиц в неполярных органических растворителях. Значения предельного парциального молярного объема олеиновой кислоты в исследованных растворителях отличаются от молярного объема олеиновой кислоты не более чем на 6%. Это означает, что структурная упаковка олеиновой кислоты как в собственной среде, так и в бесконечно разбавленном растворе представляет собой достаточно рыхлое структурное образование, а объемы свободного («исключенного») пространства вблизи молекулы олеиновой кислоты, находящейся в окружении себе подобных, и молекул растворителя сопоставимы. В указанных выше работах определены значения предельного парциального молярного объема раствора монокарбоксильных кислот в бензоле на основе молекулярно-динамического моделирования.

стированием и градуировкой временного спектрометра альбедных нейтронов для марсохода NASA с установленным на нем нейтронным генератором, а также с созданием нейтронного и гамма-спектрометра для российской миссии «Фобос-грунт».

Совместно со специалистами ЛЯР начата реконструкция автоматизированной облучательной установки «Геном» для проведения радиобиологических экспериментов на пучках тяжелых ядер МЦ-400.

Большое внимание уделялось развитию средств спектрометрии нейтронов в рассеянных полях излучения за защитами ускорителей и в окружающей среде. Был разработан и создан портативный автономный вариант спектрометра на базе нетбука для измерений в окружающей среде.

Предложена методика расчета гребенчатого фильтра с целью формирования пучка ядер углерода для мишенной терапии опухолей [20].

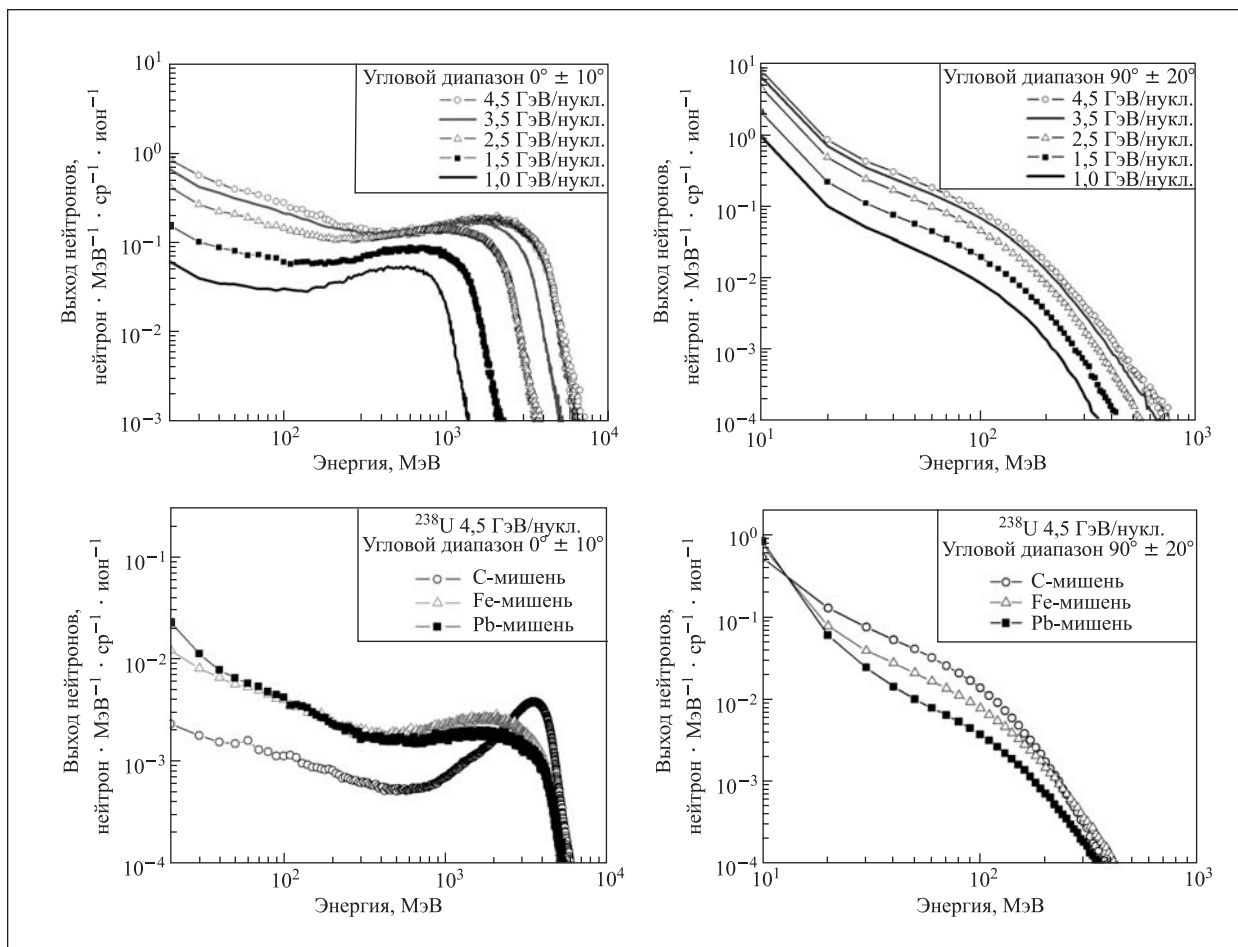


Рис. 8. Выход двойных дифференциальных нейтронов при взаимодействии ядер урана различных энергий с толстой мишенью из различных материалов

В рамках выполнения межгосударственного научного соглашения России и Индии в части проекта А-2.53 PUC-12/IC-XII на медицинском пучке фазотрона ЛЯП проводятся эксперименты по исследованию характеристик новых нанокристаллических

термолюминесцентных детекторов, разработанных в Индии, а также исследования свойств новых защитных материалов с помощью изотопных нейтронных источников.

КОНФЕРЕНЦИИ И ОБРАЗОВАНИЕ

В течение 2009 г. сотрудники лаборатории приняли участие более чем в 15 научных конференциях в России и в 6 конференциях, проходивших в различных странах Европы и Азии.

Продолжался учебный процесс на кафедре «Биофизика» Международного университета «Дубна». В настоящее время по специальности «Радиационная безопасность человека и окружающей среды» обучается 88 студентов и 2 аспиранта по специальности «Радиобиология». В 2009 г. на кафедру было принято 15 новых студентов. 20 студентов успешно закончили обучение и получили диплом инженера-физика.

Сотрудники сектора компьютерного молекулярного моделирования (КММ) продолжают занятия по курсу «Молекулярная динамика» со студентами старших курсов Международного университета «Дубна». Успешно защищены дипломные работы по различным аспектам гомологичного моделирования и молекулярной динамики в исследовании наносистем и протеинов. Занятия со студентами университета «Дубна» велись на базе кафедр биофизики и химии (кафедра химии, геохимии и космохимии). В 2009 г. начальник сектора КММ Х.Т. Холмуродов был приглашен в качестве Visiting Professor на факультет науки и технологий Университета Кейо — одного из самых престижных частных университетов Японии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baranova E. V. et al. Evaluation of the Influence of Some Factors on γ -induced Apoptosis in Human Peripheral Blood Lymphocytes // AIP Conf. Proc. Slovak Republic. 2009. V. 1204. P. 241–242.
2. Baranova E. V. et al. The Influence of Modifying Factors on Radiation Induced Apoptosis in Human Lymphocytes // NATO ATC RADIPER book, Poland, 2009 (in press).
3. Ravnachka I. I. et al. DNA Double-Strand Break and Apoptosis Induktion in Human Lymphocytes at Different Phases of Cell Cycle After Irradiation by Gamma Rays ^{60}Co and Protons in Bragg Peak // Third Intern. Sci. Conf. FMNS-2009, Blagoevgrad, Bulgaria (in press).
4. Belyakova E., Dubnickova M., Boreyko A. // Effect of Low Dose Gamma Irradiation Together with Lipid A on Human Leukocytes Activities *In Vitro* // AIP Conf. Proc. Slovak Republic, 2009. V. 1204. P. 245–246.
5. Кадышевская Е. Ю., Колтовая Н. А. Участие генов *SRM5/CDC28*, *SRM8/NET1*, *SRM12/HFI1* в чекпойнт-контроле у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. 2009. Т. 45, № 4. С. 458–470.
6. Холмуродов Х. Т., Колтовая Н. А. МД-моделирование киназы CDK2-циклин А: влияние замены аминокислот Gly16 \rightarrow Ser16 и Arg284 \rightarrow Gln284 на конформацию киназной субъединицы // Биофизика. 2009. Т. 54, вып. 6. С. 999–1004.
7. Koltovaya N. A. et al. CDC28, NET1, and HFI1 are Required for Checkpoints in *Saccharomyces cerevisiae*. JINR Preprint E19-2009-95. Dubna, 2009.
8. Zaytseva E. M. et al. Comparative Analysis of the *In Vitro* Sensitivity of Human Lymphocytes Exposed to Radiation of Different LET // AIP Conf. Proc. 2009. V. 1024. P. 239–240.
9. Deperas-Kaminska M. et al. Individually Variable Aberration Frequencies in Chromosomes 2, 8 and 14 of Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed to Charged Particles of Different LET // Intern. J. of Radiation Biology (in the second review).
10. Belov O. V., Krasavin E. A., Parkhomenko A. Yu. Model of SOS-Induced Mutagenesis in Bacteria *Escherichia coli* under Ultraviolet Irradiation // J. Theor. Biol. 2009. V. 261, No. 3. P. 388–395.
11. Белов О. В., Красавин Е. А., Пархоменко А. Ю. Динамика SOS-ответа в бактериальных клетках *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении // Письма в ЭЧАЯ. 2009. Т. 6, вып. 3. С. 418–439.
12. Белов О. В., Красавин Е. А., Пархоменко А. Ю. Математическая модель индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении // Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49, № 5. С. 617–628.
13. Красавин Е. А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991.
14. Муранов К. О. и др. Сравнительное исследование влияния старения, ультрафиолетового и радиационного облучения на возникновение и развитие катаракты // Радиационная биология и радиоэкология (в печати).
15. Ostrovsky M. A. et al. Combined Action of UV (UV-B) and γ -Radiation as an Escalating Risk Factor in Cataract Formation of Mice // Radiation and Environmental Biophysics (submitted).
16. Kholmurodov Kh. T. Molecular Simulation in Material and Biological Research. N. Y.: Nova Sci. Publ. Ltd., 2009.
17. Feldman T. B. et al. Studies on the Conformational State of the Chromophore Group (11-cis-Retinal) in Rhodopsin by Computer Molecular Simulation Methods // Biophysics. 2009. V. 54, No. 4. P. 465–470.
18. Авдеев М. В. и др. Определение предельного парциального мольного объема растворов монокарбоксильных кислот в бензоле методом молекулярно-динамического моделирования // Журнал физической химии. 2009. Т. 83, № 7. С. 1275–1280.
19. Timoshenko G., Paraipan M. Formation of Secondary Radiation Fields at NICA // Nucl. Instr. Meth. B. 2009. V. 267. P. 2866–2869.
20. Babkin V. A. et al. SOBP Forming for Carbon Therapy // Central Eur. J. of Phys. (in press).