

На правах рукописи

Риттер Генрих Сергеевич

**ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ РАДИОПРОТЕКТОРНОГО
ДЕЙСТВИЯ ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ РНК
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1.5.22. – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в лаборатории индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Богачев Сергей Станиславович**
д.б.н., зав. лаб. индуцированных клеточных процессов ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты: **Баклаушев Владимир Павлович**
д.м.н., зам. ген. директора по научной работе в ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России», г. Москва.

Васильев Станислав Анатольевич
д.б.н., руководитель лаб. инструментальной геномики НИИ «Медицинской генетики Томского НИМЦ РАН», г. Томск.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в конференц-зале Института по адресу: проспект академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел.: +7(383) 363-49-06 (1321); факс: +7(383) 333-12-78;

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: <https://www.icgbio.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В современном мире радиобиологическая безопасность населения России имеет не только фундаментальное, но и практическое значение. Масштабное использование атомной энергии в промышленности, использование высокодозового облучения в медицине, применение облучения при создании продуктивных сортов зерновых культур, исследование космоса, а также сохраняющаяся угроза военного конфликта с применением ядерного оружия, представляют потенциальную опасность для нынешнего и будущих поколений россиян. Это означает, что поиск эффективных, нетоксичных веществ, обладающих радиопротекторными свойствами, остается одной из приоритетных задач.

Цель работы: Изучить клеточные и молекулярные механизмы радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *S. cerevisiae*

Задачи:

1. Оценить временные параметры радиопротекторного действия препарата РНК полученного из пекарских дрожжей *S. cerevisiae*;
2. Установить активную субстанцию препарата суммарной РНК дрожжей, определяющую его радиопротекторные свойства;
3. Изучить механизм радиопротекторного действия препарата дцРНК;
4. Сравнить в прямом эксперименте эффективность радиозащитного действия штатного радиопротектора Б-190 и нового радиопротектора - препарата дцРНК.

Научная новизна работы. В настоящем исследовании был установлен и охарактеризован новый радиопротектор – препарат дцРНК, полученный из суммарной РНК пекарских дрожжей *S. cerevisiae*. В рамках работы была определена мишень радиозащитного действия препарата дцРНК, разработана модель механизма радиопротекторного действия нового препарата и экспериментально доказаны основные её положения.

Теоретическая и практическая значимость работы. В исследовании охарактеризован новый радиопротекторный препарат с новым принципом действия. При создании технологии масштабного производства новый радиопротектор может быть использован профессионалами, чья сфера деятельности связана с повышенными радиационными рисками и в чрезвычайных ситуациях, простыми гражданами, в качестве доступного и эффективного радиозащитного средства.

Положения, выносимые на защиту:

1. Двуцепочечная РНК (дцРНК), полученная из тотальной РНК дрожжей *S. cerevisiae*, при внутривенном введении экспериментальным мышам, достигает внутренних компартментов гемопоэтических стволовых клеток в не деградированной форме, и, в случае последующего облучения

животного летальной дозой радиации, способствует сохранению жизнеспособности этих клеток, а так же индуцирует их пролиферацию и выход в кровоток.

2. Гемопоэтические стволовые клетки, циркулирующие в кровотоке и сохранившие жизнеспособность после облучения, фиксируются в опустошенной паренхиме селезенки, где образуют герминативные центры пролиферации форменных элементов крови, обеспечивающие быстрое восстановление популяции клеток иммунной и кроветворной систем.
3. Двучепочечная форма и открытые концы молекул являются факторами, определяющими радиопротекторный эффект дцРНК, при ее взаимодействии с низкодифференцированными предшественниками гемопоэтических клеток крови, в частности, с-Kit/CD34.

Структура и объем работы. Диссертация включает в себя список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 129 страницах, содержит 46 рисунков и 6 таблиц.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на шести научных конференциях в виде устных и стендовых докладов. По материалам работы опубликовано пять статей в Российском и зарубежных рецензируемых журналах.

Вклад автора. Все описанные в данной работе научные результаты были получены или самим автором или при его непосредственном участии.

Благодарности автора. Автор выражает благодарность Николину В. П., Поповой Н.А., Дубатовой Т.Д., Таранову О.С., Байбородину С.И., Ефремову Я.Р., Мещаниновой М.И., Веняминовой А.Г., Сеницыной О.И, Шевченко А.И., а также всем сотрудникам лаборатории индуцированных клеточных процессов за помощь в теоретической и практической реализации данной работы и за существенные профессиональные замечания, позволившие улучшить работу на стадии написания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обработка мышей радиопротекторными препаратами. 7-10 мг Σ РНК в 0,5 мл физраствора и 160-200 мкг дцРНК в 0,2 мл физраствора вводили мышам внутривенно.

Облучение экспериментальных животных. Облучение мышей проводили на цезиевом источнике ИГУР-1 дозой 9,4 Гр при мощности дозы 0,76 Гр/мин [Likhacheva et al., 2007 b].

Хроматография на ГАП. Раствор суммарной РНК наносили на колонку с гидроксипатитом. Элюцию проводили 0,15 и 0,25 М PBS. Профиль элюции контролировали спектрофотометром [Остерман, 1985].

Реакция Дише. Препарат суммарной РНК гидролизovali в растворе едкого натра (0,1 М NaOH) 24 часа при 37°C, после чего раствор охладили до 0°C, довели до 1 М HClO₄ и инкубировали 5 минут. После этого раствор центрифугировали 15 минут при 5000g. Осадок отмыли 70% спиртом и растворили в воде. Далее добавили 2 объема дифениламинового реактива. Раствор инкубировали в течение 15-20 мин на кипящей водяной бане, после чего анализировали [Шапиро, 1976].

Включение радиоактивной метки на 5'-конец Flu-РНК. Радиоактивную метку вводили при помощи полинуклеотидкиназы T4 по методике описанной в [Мазин и др., 1990].

Анализ свечения органов мышей. Через 3 часа после внутривенного введения P32 меченого материала из мышей выделяли органы. Органы помещали в специальные виалы и анализировали на сцинтилляционном счетчике «Ракбета». Значения нормировали на массу органа.

In vitro интернализация Flu-дцРНК в ККМ и Кребс-2. Клетки инкубировали 30 минут в 200 мкл RPMI-1640 с добавлением 0,1 мкг Flu-дцРНК. После инкубации, клетки промывали средой и ресуспендировали в RPMI-1640. [Dolgova et al, 2012 a].

Стимуляция колониеобразования препаратом дцРНК. Клетки костного мозга инкубировали с 0,2 мкг/мл дцРНК 2,5 часа. Далее клетки выращивали на метилцеллюлозной среде и анализировали согласно протоколу производителя (Stem Cell Technologies).

Анализ крови облученных мышей. Мышей (C57BL) облучали γ -радиацией дозой 8 Гр (LD 50/30). После этого каждый второй день у мышей забирали кровь из хвостовой вены и делали мазки. Мазки окрашивали по Романовскому-Гимзе и анализировали под проходящим светом.

Анализ интернализации P32-дцРНК в клетки Кребс-2. 40 млн. клеток Кребс-2 инкубировали в 4 мл физраствора с 2 мкг P32-дцРНК 30 минут, 37°C. Далее клетки отмыли и ресуспендировали в 10 мл среды RPMI-1640 + 10% FBS. Клетки сортировали по признаку «Flu+» и «Flu-». В результате было насортировано 3 млн. клеток «Flu+».

Из клеток выделили РНК тризолом и разделили на 20% ПААГ.

Обработка клеток ингибиторами эндоцитоза. В суспензию клеток добавляли ингибитор в концентрациях, указанных в разделе «результаты». Инкубацию проводили в среде АМЕМ 30 минут при КТ. После этого клетки промывали и ресуспендировали в 200 мкл АМЕМ. Клетки обрабатывали Flu-дцРНК, доводили до 500 мкл и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III [Чинак и др. 2016].

Оценка динамики репарации ДЦР по гистону γ -H2AX. Костный мозг мышей выделяли через 30, 60 и 120 минут после облучения дозой 9,4 Гр.

Суспензию клеток костного мозга фиксировали добавлением равного объема 4% параформальдегида, после чего их инкубировали 1 час при 4°C. Далее клетки последовательно обрабатывали кроличьими антителами к гистону γ -H2AX (anti-phospho-histone Sigma) и FITC мечеными козьими антителами против IgG кролика (goat anti rabbit IgG FITC-conjugate Sigma). ДЦР анализировали по росту и спаду количества FITC+ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III [MacPhail et al. 2003].

Оценка динамики репарации ДЦР по белкам репарации XRCC4 и RAD51. Костный мозг вымывали холодным PBS из бедренных костей мыши через 30, 60, 120 и 240 минут после облучения. Далее клетки отмыли инкубировали 30 минут при 4°C в лизирующем буфере (150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM PMSF; 1 мкг/мл aprotinin; 10 mM EDTA). 40 мкл лизата разделили на 10% ПААГ, и перенесли на нитроцеллюлозную мембрану. После этого мембрану обрабатывали по стандартному протоколу первичными антителами к RAD51 (ABclonal, A6268), XRCC4 (ABclonal, A1677) и β -actin (ABclonal, AC026) и вторичными антителами с пероксидазой хрена (Sino Biological Inc., SSA003). После проявки интенсивность бандов анализировали программой Gel-Pro Analyzer.

Введение препарата Б-190. Препарат Б-190 вводился в желудок мышам с помощью специального зонда за 20 минут до облучения. Препарат измельчили и ресуспендировали в растворе H₂O с Tween 20. Мышам вводили 2,5 мг/мышь в 0,25 мл раствора.

Статистическая обработка. Для анализа выживаемости проводили Log-rank тест используя функцию survdiff из R пакета survival v3.5-5. Кривые попарно сравнивали с контролем, после чего делали поправку на множественные сравнения, используя поправку Бонферони.

Значения СРМ (события в минуту) нормировали на массу исследуемого органа или образца ткани. Достоверность отличий в накоплении органами меченных ККМ проводили Kruskal-Wallis тест с последующим post hoc анализом тестом Данна.

Ингибирование эндоцитоза анализировали методом парного теста Вилкоксона относительно не обработанного ингибитором контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть I. Поиск и характеристика активной субстанции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей ее радиозащитные свойства

Эффект пролонгированного радиопротекторного действия препарата дрожжевой РНК. На первом этапе была оценена длительность радиозащитного действия препарата РНК дрожжей. РНК дрожжей вводилась экспериментальным животным в количестве 7 мг за 1 час, за 4, 8 и 12 суток до облучения летальной

дозой радиации 9,4 Гр (**Рис. 1**). Оказалось, при облучении, проводимом через 1 час и на 4 сутки от введения препарата РНК, к 70 суткам наблюдения выживает 100%, а при облучении на 8 и 12 сутки – 60% животных.

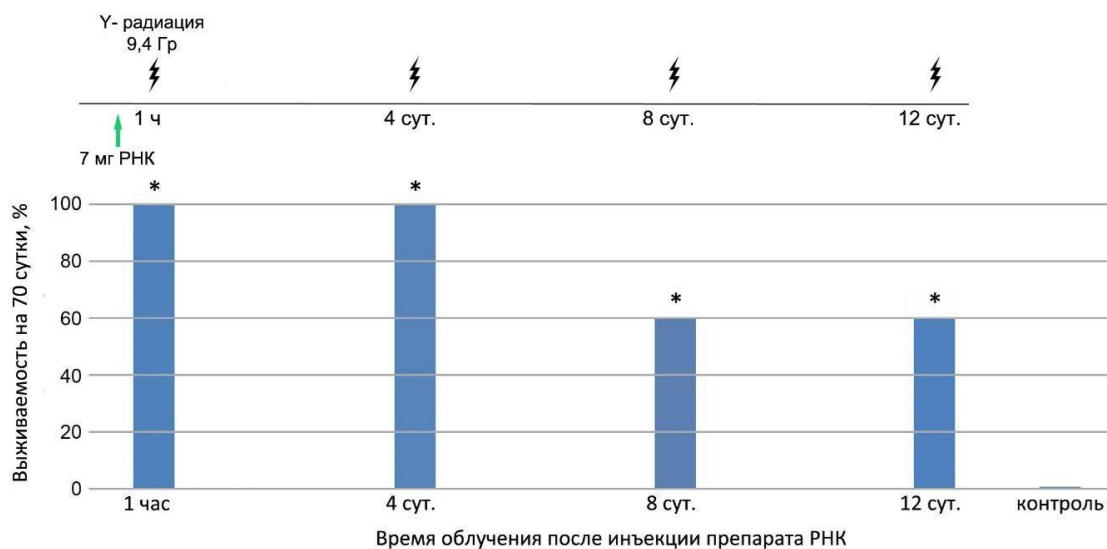


Рис. 1. Выживаемость мышей при обработке препаратом РНК за 1 час и 4, 8 и 12 суток до облучения абсолютно летальной дозой 9,4 Гр (n=5, *p<0.05).

Поиск активного вещества в препарате суммарной РНК дрожжей.
 Аналитическое исследование (хроматография на гидроксиапатите (ГАП)) препарата суммарной РНК дрожжей показало, что препарат содержит одноцепочечную РНК (элюция 0,15 М PBS), и двуцепочечную нуклеиновую кислоту (элюция 0,25 М PBS) (**Рис. 2А**).

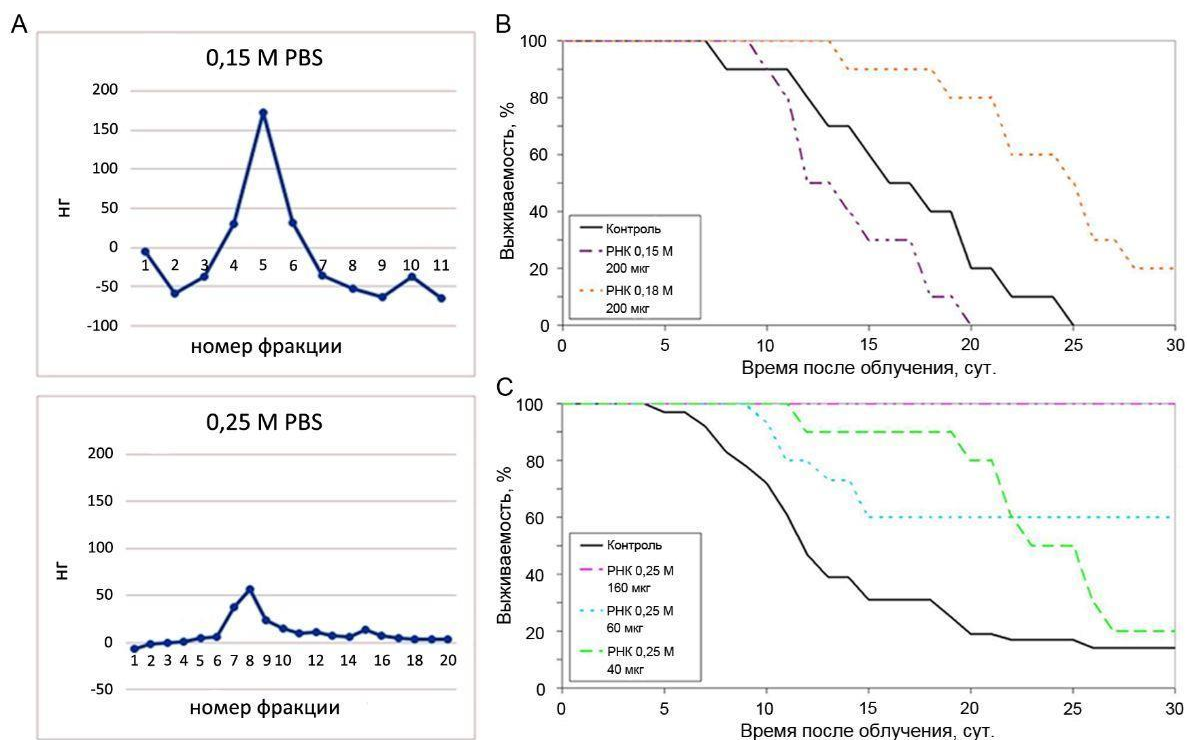


Рис. 2. Хроматография суммарной РНК дрожжей на ГАП. А) Профили элюции нуклеиновых кислот в 0,15 М и 0,25 М PBS. В) Радиопротекторные свойства 0,15 М фракции (n=10). С) Радиопротекторные свойства 0,25 М фракции (n=10) (p<0.05).

Эксперименты с мышами показали, что радиопротекторными свойствами обладает только фракция, элюирующаяся в 0,25 М PBS. При этом для достижения 100% выживаемости необходимо лишь 160 мкг препарата на мышь (**Рис. 2В,С**) (при использовании суммарного препарата РНК необходимо 7 мг на мышь).

Определение типа нуклеиновой кислоты элюированной 0,25 М PBS.

Тип нуклеиновой кислоты (НК) был определен при помощи цветной реакции на дезоксирибозу - реакцией Дише. Для этого 80 мг препарата суммарной РНК гидролизовали мягкой щелочью, после чего осадок кипятили в дифениламиновом реагенте. В таком количестве материала, по грубым оценкам, содержится 80-100 мкг дцНК, которые в случае ДНК давали бы синий цвет реакционной смеси, а в случае РНК зеленый. Проведенная реакция демонстрирует зеленый цвет раствора (**Рис. 3**). Полученный результат свидетельствует, что в суммарном препарате РНК присутствует фракция двуцепочечной РНК (дцРНК), которая является действующим веществом, определяющим радиозащитные свойства дрожжевой РНК.



Рис. 3. Результаты цветной реакции различных количеств стандартного препарата ДНК в сравнении с препаратом дцНК, полученном после гидролиза 80 мг суммарной дрожжевой РНК.

Клонирование и секвенирование фрагментов двуцепочечной РНК. Анализ секвенированных клонов. Является ли определяющей для осуществления радиопротекторного действия первичная структура дцРНК?

В результате клонирования и секвенирования дцРНК фрагментов, было определено, что изучаемые фрагменты относятся к рибосомальным РНК или РНК белков, ассоциированных с рибосомами *S. cerevisiae*. В ходе анализа вторичных структур молекул дцРНК было установлено, что радиопротекторным действием обладает только открытая с двух сторон форма дцРНК.

Часть II. Поиск и характеристика клеточной мишени, воздействие на которую обуславливает радиозащитный эффект дцРНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*.

Модель радиопротекторного действия препарата дцРНК. Разработанный экспериментальный дизайн настоящей части исследования был основан на нескольких общих соображениях, вытекающих из проведенного анализа литературы и наших многочисленных пилотных экспериментов. Было сделано предположение, что радиозащитный эффект дцРНК определяется несколькими факторами, а именно:

1. Сохранением молекулы дцРНК в кровяном русле в не деградированном состоянии.
2. Интернализацией дцРНК низкодифференцированными эукариотическими клетками, включая ГСК, что сопровождается спасением гемопоэтических предшественников от γ -радиации, активацией их пролиферации и мобилизацией.
3. Фиксацией спасенных и распространяющихся кровотоком гемопоэтических предшественников в паренхиме селезенки с формированием герминативных центров пролиферации.

Устойчивость молекул дцРНК к деградации нуклеазами крови и их распределение по органам. Характеристика двуцепочечной РНК как активной

субстанции, обладающей радиопротекторным действием, предполагает, ее сохранность в кровяном русле в виде двуцепочечного полимера. Для проверки устойчивости молекул дцРНК в кровяном русле был использован искусственный дцРНК-зонд, меченый FAM флуорохромом.

Искусственную молекулу дцРНК, получали путем отжига одноцепочечных РНК-адаптеров состоящая из двух комплементарных цепей, длиной 68 п.о., на 3'-концах которых была присоединена флуоресцентная метка 6-FAM (Рис. 4).

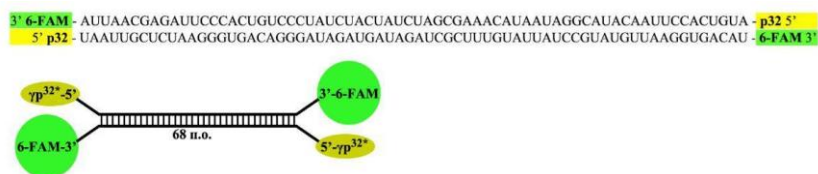


Рис. 4. Искусственная молекула дцРНК, несущая на 3'-концах 6-FAM флуорохромную метку, а на 5'-конце радиоактивный фосфор.

Для визуализации дцРНК зонда в крови, его дополнительно метели с 5'-концов радиоактивным фосфором P^{32} (Рис. 4), после чего инфузировали в кровотоки. Через 5 минут, 1 час и 2 часа после инфузии образцы крови анализировали в агарозном гель-электрофорезе. Гель высушивали и афтордиографировали (Рис. 5А). Показано, что радиоактивно меченый зонд не деградирует в кровяном русле на протяжении как минимум одного часа.

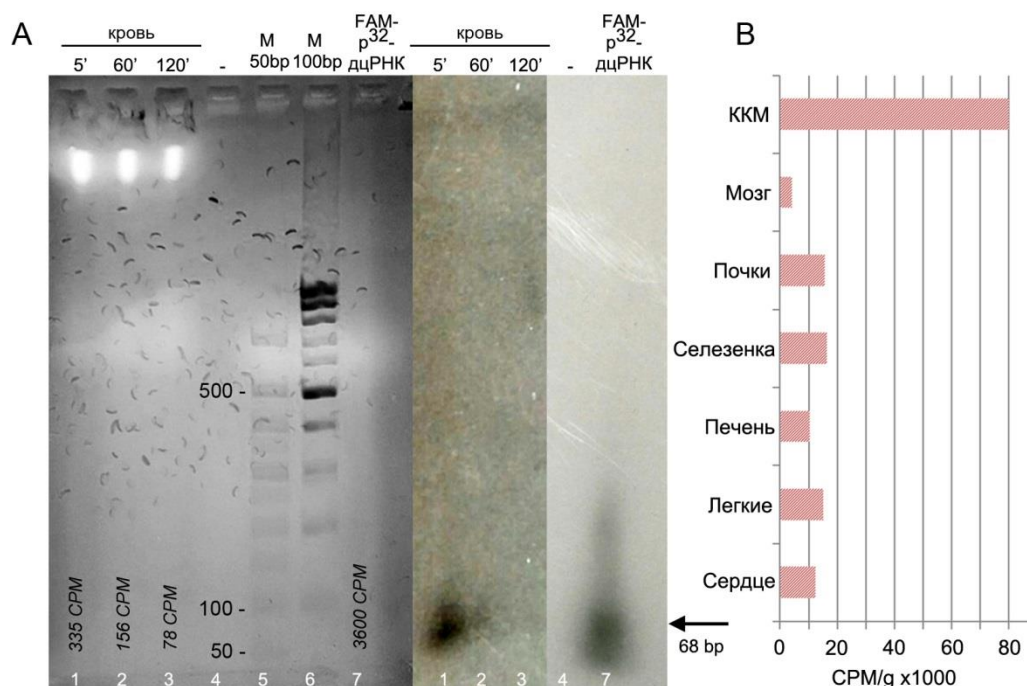


Рис. 5. Анализ устойчивости P^{32} -дцРНК зонда в крови и его распределение по органам мыши. А) Электрофоретическая подвижности P^{32} -меченого дцРНК зонда, выделенного

из крови мыши через 5, 60 и 120 минут после его введения (агарозный электрофорез – слева, автордиограмма – справа). В) Распределение P^{32} -меченого материала в органах мыши через 3 часа после его внутривенного введения.

Устойчивость дцРНК зонда в кровяном русле позволило оценить распределение P^{32} -меченого материала по органам экспериментальных животных. Показано, что радиоактивная метка в составе дцРНК зонда фиксируется преимущественно в костном мозге (Рис. 5В).

Низкодифференцированные гемопоэтические стволовые клетки способны интернализировать FAM-меченый материал. Обработка клеток костного мозга искусственной дцРНК стимулирует колониеобразование гемопоэтическими предшественниками. FAM- меченый флуорохром доставляется в ККМ только в составе полимерной формы РНК. Проведенное типирование ККМ показало, что FAM+ клетки являются низкодифференцированными клетками (C-kit) и ранними мультипотентными прогениторами (CD34+) (Рис. 6С, D). Обработка костного мозга дцРНК индуцировала колониеобразование гемопоэтическими предшественниками. Наиболее чувствительным к обработке оказался гранулоцитарно-макрофагальный гемопоэтический росток (Рис. 6В).

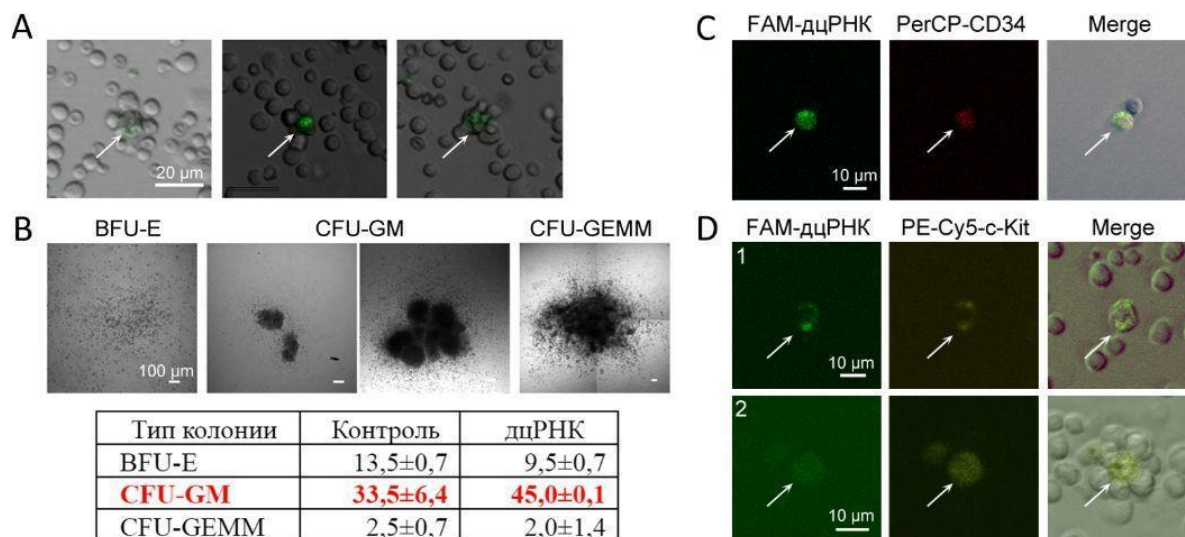


Рис. 6. Цитологический анализ клеток костного мозга как мишени воздействия дцРНК. А) Панель розеток, предположительно костно-мозговых стволовых ниш, после инкубации клеток с FAM-дцРНК. В центре розетки находится FAM+ клетка. В) Морфология колоний, образованных гемопоэтическими предшественниками костного мозга после их стимуляции искусственной дцРНК. Ниже приведено количество колоний отдельных ростков со стандартным отклонением. С) Позитивная одновременно по двум маркерам CD34+/FAM+ клетка костного мозга. D) Клетки костного мозга одновременно позитивные по FAM и c-Kit маркерам. 1 – индивидуальная клетка; 2 – клетка в составе розетки, предположительно костно-мозговой стволовой ниши.

Анализ количества и состояния форменных элементов крови у мышей, обработанных препаратами РНК и облученных дозой 8 Гр. Установлено, что на 10-12 сутки после облучения в опустошенной крови экспериментальных групп, обработанных препаратом РНК, появляются юные предшественники всех ростков кроветворения (Рис. 7А), что свидетельствует об активной пролиферации спасённых гемопоэтических предшественников.

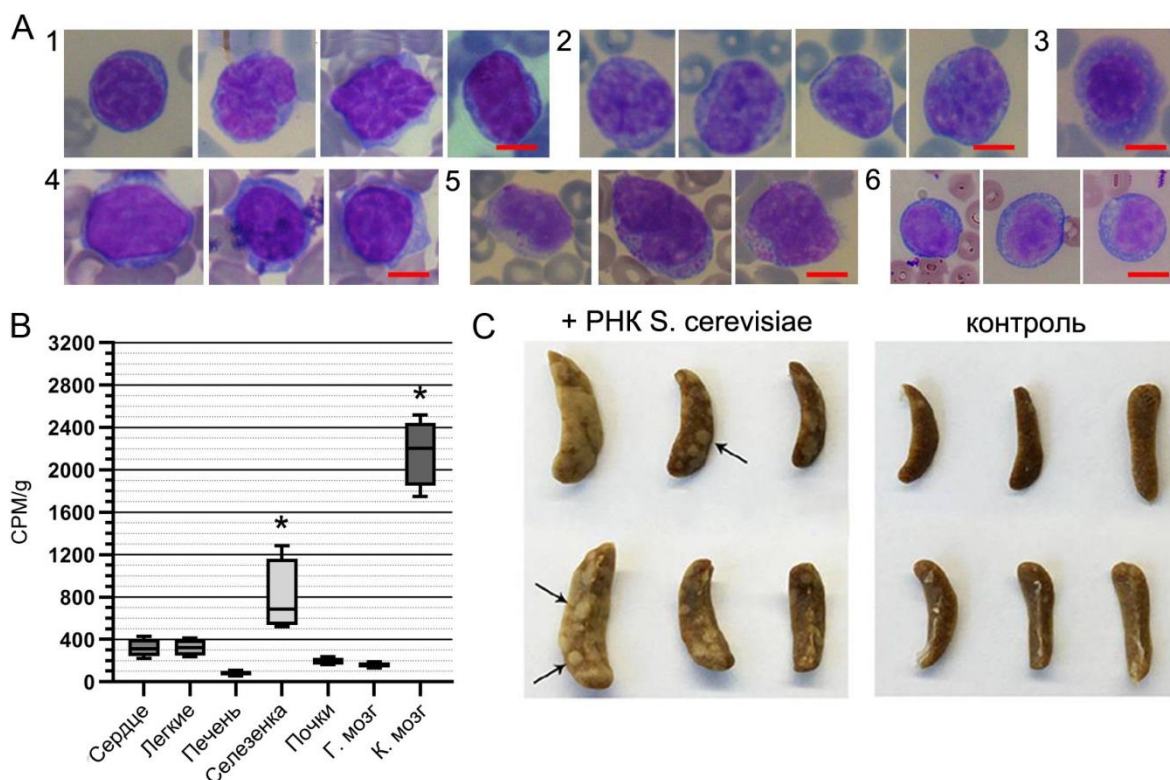


Рис. 7. Анализ органов мышей, облучённых 8 Гр. А) Юные гемопоэтические предшественники, обнаруженные в кровотоке. В) Хоуминг радиоактивно меченых FAM-P³²-дцРНК ККМ после реинфузии. *p<0.05. С) Лейкоцитарные колонии в селезенках мышей, обработанных препаратом дрожжевой РНК (≈27/селезенку), и у контрольных животных (≈1/селезенку). Лейкоцитарные колонии указаны стрелками. Бары – 10 мь.

Определение критического органа хоуминга FAM+ гемопоэтических стволовых клеток. Клетки костного мозга обрабатывали P³²-дцРНК. Как следует из проведенных экспериментов, меченный материал будет захвачен только ГСК. Показано, что циркулирующие в кровяном русле гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) преимущественно закрепляются в костном мозге и селезенке мышей (Рис. 7В). Закрепившиеся в селезенках ГСК дают начало лейкоцитарным колониям (Рис. 7С).

Часть III. Доказательство интернализации фрагментов дцРНК в эукариотическую клетку. Экстраполяция данных на ГСК

Количество с-Kit/CD34 ГСК в костном мозге составляет менее 0,1% популяции. Этот факт ограничивал возможность анализа механизма интернализации фрагментов дцРНК в гемопоэтические прогениторные клетки. В этой связи, эксперименты, описанные в настоящем разделе работы, были проведены на модели стволовых опухолевых клеток (СОК) Кребс-2, которые несут маркер CD34, интернализуют FAM-дцРНК зонд и процент которых может достигать 10% от общей популяции (Рис. 8).

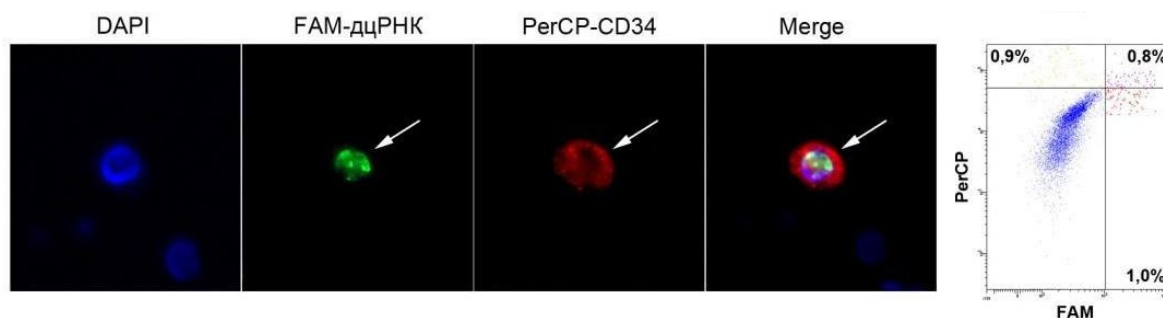


Рис. 8. Цитологический и проточно-цитометрический анализ интернализации фрагментов FAM-дцРНК в CD34+ клетки Кребс-2. FAM-дцРНК и TAMRA-дцДНК.

Прямое доказательство интернализации искусственной дцРНК в эукариотическую клетку (на примере клеток асцитной карциномы Кребс-2). Результаты фазово-контрастного анализа свидетельствовали, что меченый флуорохромом материал локализуется в определенных внутренних компартаментах клетки Кребс-2 (Рис. 9).

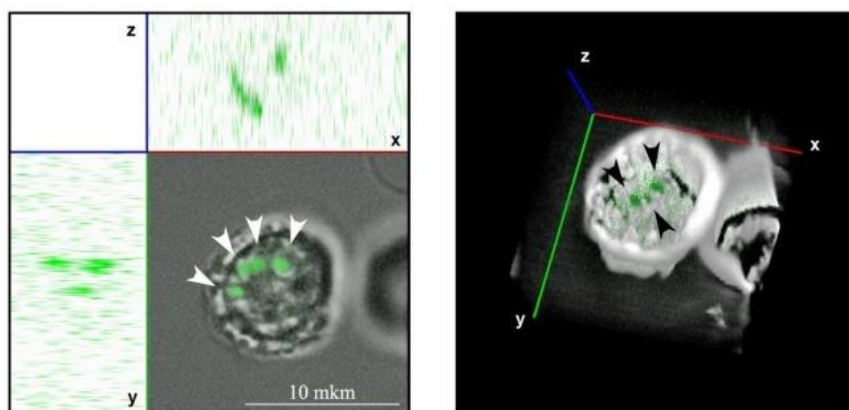


Рис. 9. Локализация FAM-метки в клетке Кребс-2.

Были проведены эксперименты по прямому доказательству FAM-дцРНК в СОК Кребс-2. Клетки Кребс-2 инкубировали с FAM- P^{32} -дцРНК, после чего их сортировали по признаку FAM+ и FAM-. Из сортированных клеток выделили РНК и провели полиакриламидный гель-электрофорез с последующей автордиографией. Полученные результаты свидетельствуют, что

интернализованная FAM- γ P³²-дцРНК находится в клетке Кребс-2 в исходном, не деградированном виде (**Рис. 10**). Аналогичный результат был получен для РНК, выделенной из очищенных ядер, при этом было установлено, что практически вся интернализованная дцРНК находится в ядре.

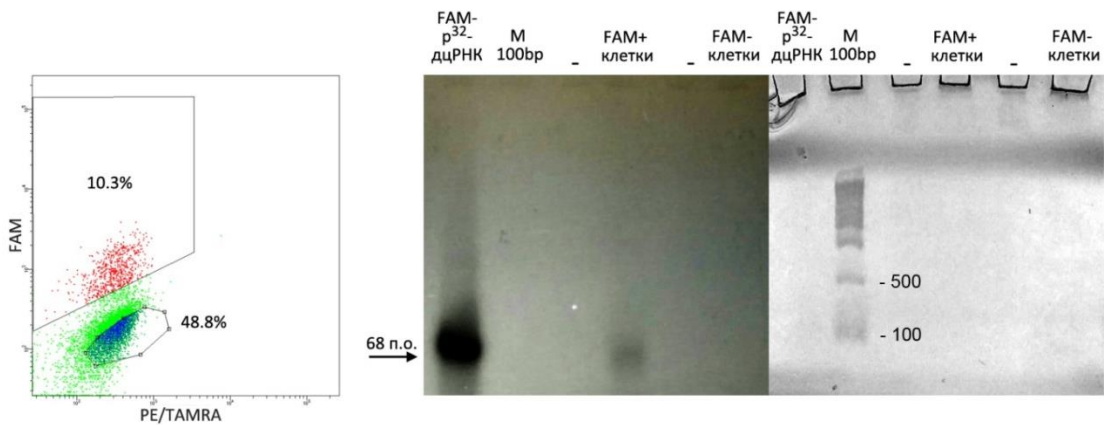


Рис. 10. Авторадиограмма и электрофорез суммарной РНК, выделенной из целых FAM+ клеток Кребс-2 с использованием тризола. Слева приведен плот FACS сортировки FAM+/- клеток Кребс-2.

Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на процент FAM+ клеток Кребс-2. Для определения механизма интернализации был использован набор блокаторов различных путей эндоцитоза. Обнаружено, что вортманнин, нистатин и азид натрия статистически значимо снижают процент клеток, интернализующих FAM-дцРНК (**Рис. 11**). Полученный результат свидетельствует, что дцРНК интернализуется в клетку клатрин- и кавеолин-зависимым эндоцитозом с использованием энергии АТФ. Отдельно удалось определить предполагаемый фактор связывания дцРНК (масса > 500kDa).

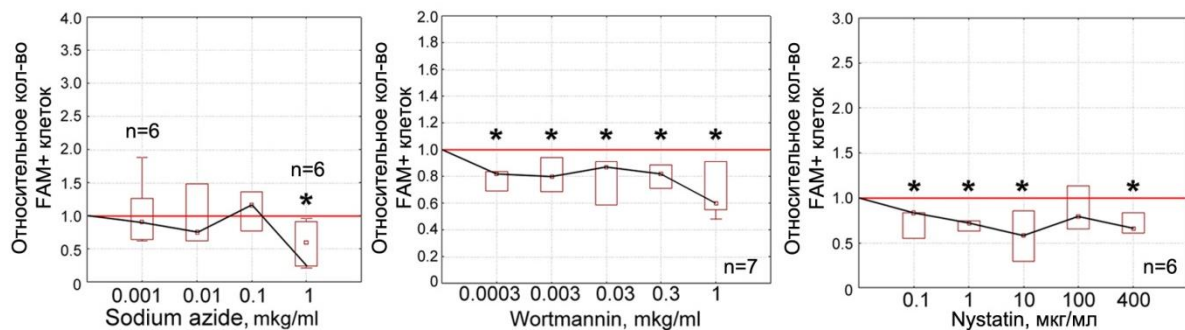


Рис. 11. А) Ингибирование интернализации FAM-дцРНК клетками Кребс-2. Значения нормировались на контроль без обработки. Звездочками обозначены значения, статистически отличающиеся от контрольного (* $p < 0,05$). Красной линией обозначено содержание FAM+ клеток в контроле (n=3 во всех случаях, если это специально не указано).

Часть IV. Предположительная модель участия молекул дцРНК в репарации аварийных и сложных дц разрывов.

В четвертой части исследования была проведена отдельная экспериментальная работа, характеризующая возможный молекулярный механизм радиозащитного действия препарата дцРНК. Приводятся аргументы в пользу того, что радиозащитный эффект действия фрагментов дцРНК определяется их участием в процессе репарации аварийных и сложных двуцепочечных разрывов (ДЦР), индуцированных гамма радиацией в ГСК.

В витальных тестах были оценены количество ДЦР и интенсивность репаративных процессов, происходящих в ККМ на протяжении 4 часов после облучения. ДЦР анализировали по гистону γ -H2AX (**Рис. 12А**) а репарацию с использованием антител к белкам XRCC4, как показатель активности NHEJ, и RAD51, как показатель активности гомологичной рекомбинации (HR) (**Рис. 12С**).

Максимальное количество ДЦР было зарегистрировано через 1 час после облучения (**Рис. 12А**). Анализ белков репарации показал, что количество XRCC4 (NHEJ) в облученных клетках также имеет максимум через 1 час после облучения. У RAD51 (HR) так же имеется пик в 1 час, и наблюдается повторный рост количества белка с 2 до 4 часов после облучения (**Рис. 12В**).

По литературным данным, пик в 1 час после облучения, это репарация физических ДЦР, возникшие в результате γ -облучения. На 2-4 час, по данным [Озеров и Осипов, 2015], регистрируются функциональные ДЦР.

Облучённым мышам вводили препарат РНК за 1 час до облучения, в момент максимального количества ДЦР и активности систем репарации (1 час после облучения), и через 4 часа после воздействия гамма радиации. Установлено, что радиопротекторный эффект развивается при введении дцРНК до облучения. При введении дцРНК в пик детектируемых разрушений в ядре (1 час после облучения) радиозащитный эффект практически отсутствует. У группы, обработанной дцРНК через 4 часа после облучения выживаемость сохраняется на высоком уровне (**Рис.12В**).

Одним из объяснений полученного результата является следующее: Можно предположить, что стволовые гемопоэтические клетки, находящиеся в состоянии радиотоксического стресса, не захватывают молекулы дцРНК, вследствие чего они не могут участвовать в репарации ДЦР. При инъекции за час до и через 4 часа после облучения – мыши выживают. В первом случае дцРНК депонируется во внутренних компартментах ГСК до наступления радиотоксического стресса, и участвует в репарации аварийных дц разрывов. При инъекции через 4 часа клетки восстановились от стресса и снова способны интернализировать дцРНК. В этом случае дцРНК участвует, в первую очередь, в репарации функциональных ДЦР (**Рис. 12В,Д**).

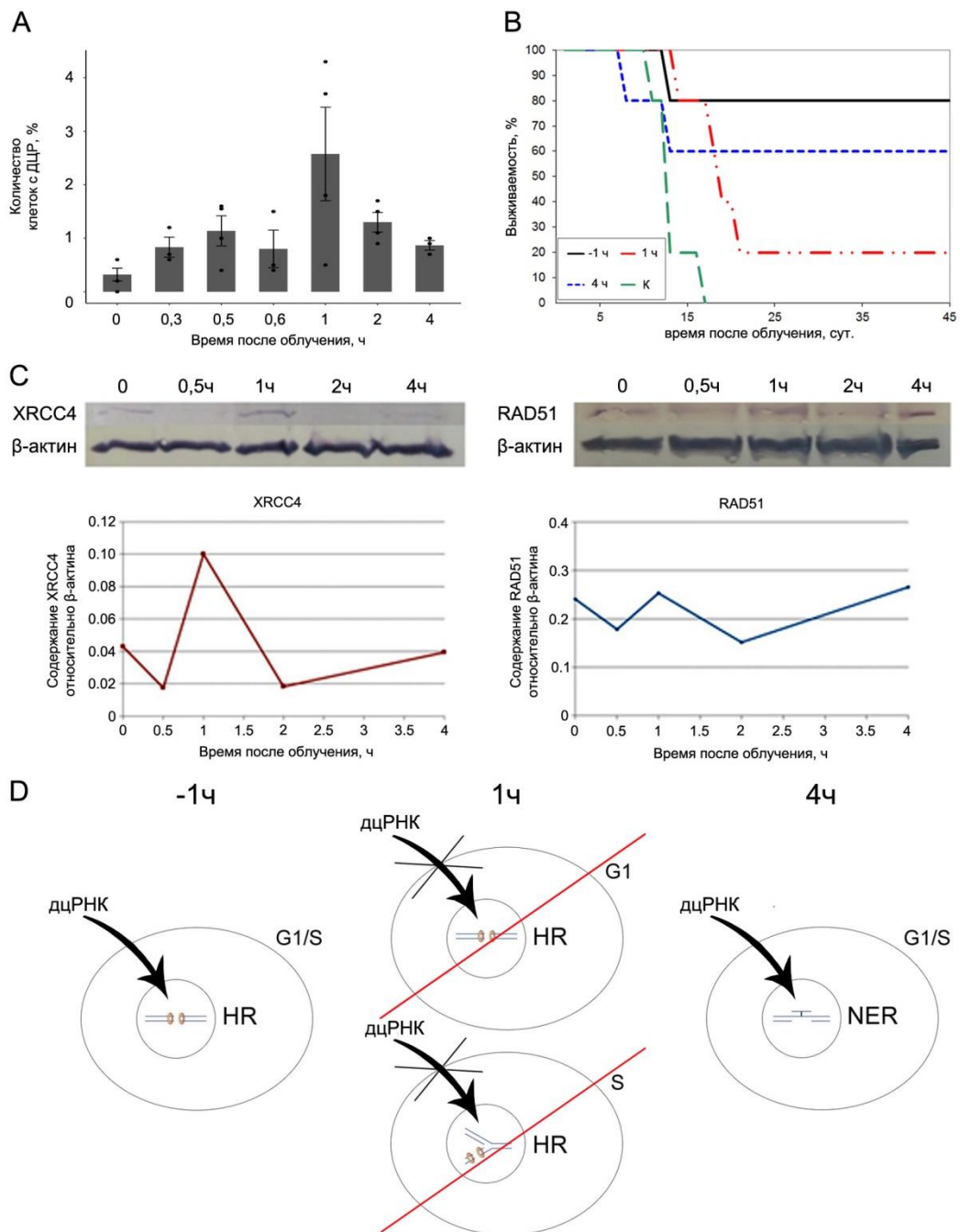


Рис. 12. Оценка динамики количества ДЦР в ККМ и белков репарации в лизате ККМ мышей, после воздействия летальной дозы γ -радиации 9,4 Гр А) Количество клеток с ДЦР. Приведена стандартная ошибка среднего. В) График выживаемости (n=5), $p < 0.05$ С) Western-блот анализ XRCC4 и RAD51 в экстрактах белков, полученных из ККМ, через различные временные интервалы после облучения. Д) Модель интернализации дцРНК в разные фазы репарации.

Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата дцРНК и штатного радиопротектора Б-190. Было проведено сравнение эффективности радиозащитного действия штатного радиопротектора Б-190 и препарата РНК в одном эксперименте. Результаты представлены на **рисунке 13.**

Установлено, что препарат суммарной РНК обладает ярко выраженным радиопротекторным действием, не уступающим по эффективности штатному препарату Б-190.

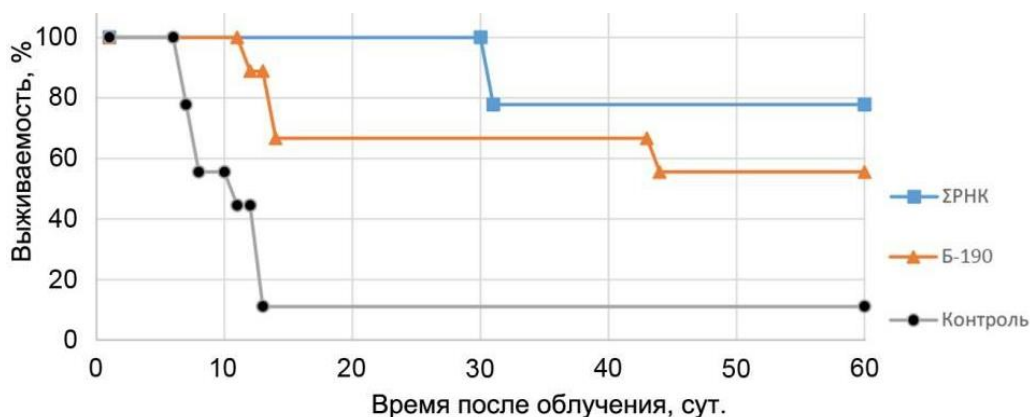


Рис. 13. Сравнение радиопротекторного действия препарата Б-190 и препарата суммарной РНК по выживаемости животных после облучения дозой 9,7 Гр (n=9), $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная модель механизма радиопротекторного действия дцРНК на настоящий момент времени выглядит следующим образом. Фрагменты экстраклеточных дцРНК интернализуются стволовыми гемопоэтическими клетками за счет нового, до конца не охарактеризованного механизма. Или за счет простого экранирования продуктов перекисного окисления, образованных γ -радиацией, или, в более сложном варианте, за счет участия в репарации повреждений ДНК, эти фрагменты способствуют или сохранению, или корректному восстановлению поврежденного хромосомного континуума. В результате стволовые клетки сохраняют жизнеспособность после летальной дозы гамма радиации. Далее происходит мобилизация выживших стволовых клеток в кровотоки и их фиксация в селезенке, где формируется пул клеток, являющихся источником восстановления иммунной и кроветворной систем организма. Мыши выживают и продолжают жить до своей естественной смерти.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что препарат РНК пекарских дрожжей *S. cerevisiae* обладает экстренным (100% выживаемость при введении за 30-60 минут до облучения) и пролонгированным (60% выживаемость при введении за 12 суток до облучения) радиопротекторным действием.
2. Установлено, что активной субстанцией препарата дрожжевой РНК, определяющей ее радиопротекторные свойства, является фракция двуцепочечной РНК, присутствующая в исходном препарате суммарной РНК. Для достижения полного радиозащитного эффекта требуется 160 мкг

дцРНК на мышь (≈ 7 мг/кг). Для проявления радиопротекторных свойств первичная последовательность молекул РНК значения не имеет. Определяющим является двуцепочечная форма и открытая конформация двуцепочечных концов.

3. Изучены особенности радиопротекторного механизма препарата дцРНК. Установлено, что:
 - дцРНК не деградирует в кровеносном русле экспериментальных животных в течение минимум 1 часа.
 - основной мишенью радиопротекторного действия препарата дцРНК является ГСК и ее ранние мультипотентные потомки. Низкодифференцированные клетки, в частности c-Kit/CD34 ГСК, способны интернализировать дцРНК природным эндоцитозом, идущим по клатрин/кавеолин-зависимому типу с использованием энергии АТФ. В результате интернализации дцРНК попадает в клетку, где она депонируется во внутриклеточных компартментах.
 - депонированные во внутренних компартментах ГСК фрагменты дцРНК участвуют во внутриклеточных событиях таким образом, что клетки, облученные летальной дозой γ -радиации, сохраняют свою жизнеспособность.
 - спасенные ГСК мобилизуются в кровоток и фиксируются в селезенке или возвращаются в костный мозг (хоуминг ГСК). В селезенках образуются герминативные центры пролиферации, создавая основу восстановления иммунной и кроветворной системы смертельно облученных мышей. Выжившие животные в течение 3 месяцев полностью седеют, при этом продолжительность жизни животных сопоставима с продолжительностью жизни интактных мышей.
4. Показано, что радиозащитное действие препарата дцРНК по эффективности не уступает штатному радиопротектору Б-190.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Риттер Г.С.**, Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Кисаретова П.Э., Таранов О.С., Дубатолова Т.Д., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Романенко М.В., Мещанинова М.И., Веньямина А.Г., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020; 24(6): 643-652.
2. **Ritter GS**, Nikolin VP, Popova NA, Proskurina AS, Kisaretova PE, Taranov OS, Dubatolova TD, Dolgova EV, Potter EA, Kirikovich SS, Efremov YR, Bayborodin SI, Romanenko MV, Meschaninova MI, Venyaminova AG, Kolchanov NA, Shurdov MA, Bogachev SS. Characterization of biological peculiarities of the radioprotective activity of double-stranded RNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Int J Radiat Biol. 2020; 96(9): 1173-1191.
3. **Ritter GS**, Dolgova EV, Petrova DD, Efremov YR, Proskurina AS, Potter EA, Ruzanova VS, Kirikovich SS, Levites EV, Taranov OS, Ostanin AA, Chernykh ER, Kolchanov NA, Bogachev SS. The new general biological property of stem-like tumor cells Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells //Frontiers in Genetics. – 2022. – Т. 13.
4. Dubatolova TD, **Ritter GS**, Proskurina AS, Kisaretova PE, Nikolin VP, Popova NA, Ruzanova VS, Taranov OS, Kolchanov NA, Bogachev SS. Changes in the number and morphology of blood cells in mice pretreated with RNA preparations and exposed to 8 Gy of gamma radiation. International Journal of Radiation Research. 2022; 20(2): 361-368.
5. **Ritter GS**; Proskurina AS; Meschaninova MI; Potter EA; Petrova DD; Ruzanova VS; Dolgova EV; Kirikovich SS; Levites EV; Efremov YR; Nikolin VP; Popova NA; Venyaminova AG; Taranov OS; Ostanin AA; Chernykh ER; Kolchanov NA; Bogachev SS. Impact of Double-Stranded RNA Internalization on Hematopoietic Progenitors and Krebs-2 Cells and Mechanism // Int J Mol Sci. 2023, 24(5): 4858.