

*На правах рукописи*

**Ратушняк Мария Григорьевна**

**Исследование действия нейропротекторов на  
нейрональные стволовые клетки после радиационного и  
химического повреждения**

Специальность 03.01.04 – «биохимия»

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины НИЦ Курчатовский институт

**Научный руководитель:** **Москалева Елизавета Юрьевна**  
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины НИЦ Курчатовский институт; профессор кафедры биологической химии лечебного факультета ФGAOУBO Первого МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России

**Официальные оппоненты:** **Гривенников Игорь Анатольевич**  
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, «Лаборатория молекулярной генетики соматических клеток», заведующий лабораторией

**Ревазова Юлия Анатольевна**  
доктор биологических наук, профессор, ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, ведущий научный сотрудник отдела генетической токсикологии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича»

**Защита диссертации состоится** «   »   2018 года в   на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 при Российском Университете Дружбы Народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, Медицинский факультет. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке медицинского факультета Российского Университета Дружбы Народов

Автореферат разослан «   »   2018 года.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Д 212.203.39  
кандидат биологических наук, доцент

Гигани О.Б.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Одним из наиболее перспективных и востребованных видов лечения широкого спектра онкологических заболеваний наряду с химиотерапией является лучевая терапия. Однако даже при оптимизированных методах лечения, обеспечивающих значительное увеличение продолжительности жизни больных, более чем в 50% случаев развиваются радиационные осложнения, вызванные повреждением нормальных тканей (Johannesen et al, 2003). Частым осложнением при лучевой и химиотерапии опухолей мозга является развитие в отдаленный период прогрессирующих нарушений таких когнитивных функций, как память и внимание, и развитие деменции у 20-50% больных, продолжительность жизни которых значительно возрастает благодаря успешной элиминации опухоли. Молекулярные и клеточные механизмы развития нарушений функций мозга при действии ионизирующего излучения и химиотерапии и подходы к профилактике и лечению таких нарушений изучены очень мало, хотя их разработка крайне актуальна. Полагают, что высокая чувствительность когнитивных функций к облучению мозга и химиотерапии у взрослых в значительной мере определяется нарушением нейрогенеза в субгранулярной зоне зубчатой извилины в гиппокампе в результате повреждения нейральных стволовых клеток (НСК) (Raber et al., 2004). При этом существенный вклад в повреждение НСК вносят активные метаболиты кислорода, образующиеся при действии ионизирующего излучения (Tseng et al, 2013, 2014). Поэтому одним из направлений поиска нейропротекторов, которые позволили бы снизить уровень повреждения НСК при облучении, является изучение соединений, обладающих антиоксидантной активностью (Oh SB, et al, 2013.). Защитным действием в отношении НСК могут обладать также нейротрофины (Nguyen N., et al. 2009) и факторы, секретируемые мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) (Munoz J. et al., 2005; Miller RH et al., 2010). В настоящее время для снижения неспецифической токсичности противоопухолевых препаратов и пролонгирования их действия разрабатываются технологии получения полимерных форм таких лекарств путем включения препаратов в полимерные частицы субмикронных размеров. Перспективным препаратом для использования в полимерной форме является этопозид. Его действие, как и действие  $\gamma$ -излучения, сопровождается образованием двунитевых разрывов (ДР) ДНК. Токсичность таких препаратов в отношении НСК не изучена.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилось изучение чувствительности НСК мыши к действию  $\gamma$ -излучения, изучение противоопухолевой активности этопозида в свободной и полимерной форме (ПФЭ) и его токсичности в отношении НСК, и поиск

способов защиты НСК от действия радиационных и химических генотоксических факторов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Получение и характеристика НСК из головного мозга мыши;
- 2) Изучение повреждения и репарации ДНК НСК при действии  $\gamma$ -излучения;
- 3) Изучение радиочувствительности НСК при действии  $\gamma$ -излучения в диапазоне малых и терапевтических доз в динамике после воздействия;
- 4) Изучение защитного действия комплекса антиоксидантов в отношении облученных НСК;
- 5) Изучение противоопухолевой активности полимерной формы этопозида в сравнении со свободным этопозидом;
- 6) Изучение токсичности ПФЭ в сравнении со свободным этопозидом в отношении НСК;
- 7) Получение и характеристика культуральной среды, кондиционированной МСК мыши (КС) из разных тканей;
- 8) Изучение защитной активности КС МСК в отношении НСК при действии  $\gamma$ -излучения и этопозида в свободной и полимерной форме.

#### **Научная новизна работы**

В настоящей работе впервые охарактеризована радиочувствительность НСК мыши, культивируемых *in vitro* в виде нейросфер и в виде прикрепляющихся клеток при действии  $\gamma$ -излучения. Впервые показано, что в НСК происходит эффективная репарация ДР ДНК, оцениваемых по образованию гистона  $\gamma$ H2AX. Впервые обнаружена стимуляция дифференцировки НСК в нейроны при действии дозы 0,1 Гр и снижение способности НСК дифференцироваться в нейроны и астроциты после облучения в дозе 4 Гр. Впервые показана высокая противоопухолевая активность полимерной формы этопозида в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Обнаружено, что МСК секретируют факторы, активность которых позволяет защищать НСК от цитотоксического действия  $\gamma$ -излучения и этопозида.

#### **Практическая значимость работы**

Важное практическое значение имеют новые данные о возможности защиты НСК от действия  $\gamma$ -излучения и действия этопозида с помощью комплекса факторов, секретируемых МСК, используемых в виде среды, кондиционированной МСК.

Практическая значимость работы заключается в том, что показана высокая противоопухолевая активность новой формы этопозида в виде полимерной формы

лекарства, что обеспечивает его меньшую токсичность и пролонгацию действия без увеличения токсичности в отношении НСК. Полученные результаты являются основой для проведения доклинических и клинических исследований этой новой формы этопозида.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были доложены: на XIII и XIV Курчатовской молодежной научной школе, НИЦ «Курчатовский институт», 2015 и 2016 г.; на Международной конференции Ломоносов - 2016.

Диссертация апробирована и рекомендована к защите 31 августа 2016 года на заседании кафедры биохимии лечебного факультета ПМГМУ им. И.М. Сеченова и на заседании Научно-технического совета Курчатовского комплекса НБИКС-технологий от 19 сентября 2017 г.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков, 12 таблиц. Состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов исследования», «Выводы», «Список использованной литературы». Список литературы содержит 186 источников.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работы, в том числе 3 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК соискателям ученой степени кандидата биологических наук:

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно проведен анализ отечественной и иностранной литературы по изучаемой теме и выполнена основная часть экспериментов, осуществлена статистическая обработка полученных данных и обсуждение результатов исследования, сформулированы выводы и оформлена диссертационная работа. Автор благодарит коллег за помощь в проведении экспериментов с животными при изучении противоопухолевой активности этопозида в свободной и полимерной форме.

### **Положения, выносимые на защиту**

В НСК мышцы обнаружена репарация ДР ДНК, оцениваемых по уровню гистона  $\gamma$ H2AX. Нейропротекторной активностью при облучении НСК в дозах 1 и 2 Гр, но не 4 Гр, обладает антиоксидант темпол. Облучение НСК в дозе 4 Гр нарушает способность выживших НСК к дифференцировке в нейроны и астроциты, при этом более значительно нарушается дифференцировка НСК в нейроны. Препарат этопозида в полимерной форме

характеризуется высокой противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo* и пролонгированным действием. Его токсичность в отношении НСК не превышает токсичность свободного этопозида. Факторы, секретируемые МСК из жировой ткани мышцы, обладают нейропротекторной активностью в отношении НСК при действии  $\gamma$ -излучения и этопозида в свободной и полимерной форме.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследований

**Выделение и культивирование НСК и МСК.** НСК выделяли из головного мозга новорожденных мышат в стерильных условиях в соответствии с опубликованными протоколами. НСК высевали в 6-луночные культуральные планшеты в плотности  $1-2 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в увлажненной атмосфере в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при содержании CO<sub>2</sub> 5% при 37°C. После формирования нейросфер их собирали центрифугированием, ресуспендировали в растворе аккутазы, промывали средой DMEM/F12. Осадок ресуспендировали в полной культуральной среде, содержащей специальные добавки и факторы для культивирования НСК, и переносили в низкоадгезивный планшет или в чашки Петри, покрытые матригелем для культивирования НСК в прикрепленном виде, в плотности 10-20 клеток/мкл для дальнейшего культивирования. За 24 часа до облучения или обработки этопозидом или ПФЭ нейросферы диссоциировали, клетки считали в камере Горяева, ресуспендировали в ростовой среде и рассеивали по лункам с плотностью 100 тыс. клеток/см<sup>2</sup> или 5 тыс. клеток/лунку.

МСК выделяли из костного (МСК-КМ) и головного мозга (МСК-ГМ) мышей в возрасте 2 месяцев. Мозг извлекали, промывали культуральной средой, измельчали скальпелем в чашке Петри и ресуспендировали в среде DMEM/F12. Клетки собирали центрифугированием, осадок дважды промывали средой, ресуспендировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 50 мкг/мл гентамицина и переносили суспензию клеток в культуральные матрасы для прикрепления и дальнейшего культивирования. МСК-КМ выделяли из костного мозга большеберцовых костей, суспензию клеток центрифугировали и клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина и переносили в культуральные флаконы на 24 часа для прикрепления к пластиковой поверхности. Через 24 часа не прикрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся клетки культивировали, пересевая после достижения субконфлюентного состояния. МСК из жировой ткани (МСК-ЖТ) выделяли из подкожного жира 30-дневных мышей. Фрагменты жировой ткани измельчали, гомогенизировали в среде DMEM/F12

без сыворотки. К суспензии фрагментов жировой ткани в среде добавляли раствор коллагеназы (0,08%) и инкубировали суспензию при перемешивании 1 ч при 37°C. Собирали клетки с помощью центрифугирования и отдельно собирали оставшиеся фрагменты жировой ткани для повторного извлечения МСК. Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10% ФБС для нейтрализации коллагеназы. Клетки собирали, ресуспендировали в культуральной среде и культивировали после прикрепления и удаления не прикрепившихся клеток.

**Культивирование клеток различных перевиваемых линий.** Клетки линии PC12 культивировали в среде DMEM, содержащей 2 mM Глутамакс, 10% лошадиной сыворотки, 5% ФБС. Клетки аденокарциномы молочной железы линии MCF-7, аденокарциномы прямой кишки линии SW837, аденокарциномы ободочной кишки линии Caco-2, карциномы сигмовидной кишки линии Colo 320HSR, легочные эмбриональные фибробласты линии LECN-4 и клетки нейробластомы мыши линии Neuro-2a культивировали в среде DMEM, содержащей 10% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки миелобластома линии K562 и резистентной к адриамицину сублинии K562<sup>ADR</sup> культивировали в среде RPMI1640 с 10% ФБС. Все линии культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. За 24 часа до эксперимента клетки снимали с подложки, и суспензию клеток переносили в культуральные 96-луночные планшеты.

**Иммуноцитохимический анализ специфических антигенов НСК мыши:** нестина, маркеров дифференцировки нейронов и астроцитов -  $\beta$ -тубулина III и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и антигенов CD133, O4, и NG2 проводили с использованием флуоресцентно-меченых антител к указанным белкам с помощью проточной цитофлуориметрии. Для анализа НСК нейросферы подвергали диссоциации, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и проводили анализ в соответствии с указаниями фирмы-изготовителя антител (АТ). Для окрашивания клеток АТ к внутриклеточным антигенам клетки предварительно пермеабелизовали 0,3%-ным раствором тритона X-100 в ФСБ, содержащим 2% БСА в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем добавляли АТ, проводили окрашивание и анализировали флуоресценцию клеток на проточном цитофлуориметре. В каждом образце анализировали 10 000 клеток.

**Облучение клеток.** Клетки облучали на установке «ГУТ- 200М» (Co<sup>60</sup>), при комнатной температуре в культуральной среде в дозах 0,1; 1, 2, 4 Гр. Клетки облучали либо в суспензии в плотно закрытых пробирках, либо прикрепленными на покровных стеклах в

культуральных планшетах. После облучения клетки помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор и инкубировали необходимое время.

**Анализ клоногенной активности.** НСК высевали в низкой плотности, облучали, культивировали в течение 7 суток, затем суспензию нейросфер аккуратно переносили в лунки планшетов, покрытые матригелем. Через 2 часа после инкубации в стандартных условиях все клетки сорбировались на подложке. Нейросферы фиксировали, окрашивали гематоксилином и фотографировали с помощью системы гель-документирования (BioRad). Подсчет колоний проводили с помощью программы Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

**Исследование выживаемости НСК с помощью МТТ-теста после токсических воздействий.** Выживаемость НСК после облучения или обработки этопозидом и ПФЭ оценивали с помощью МТТ-теста по методу Mosmann с использованием раствора МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия; Sigma) в концентрации 1 мг/мл в среде для культивирования клеток. После развития окраски (через 2-4 часа инкубации) среду удаляли, выпавшие кристаллы формазана растворяли в 100 мкл ДМСО и измеряли интенсивность окраски по поглощению при 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра (Labsystem). Выживаемость клеток оценивали в процентах от их количества в контрольных пробах. Оптическая плотность полученного раствора при оценке колориметрическим методом пропорциональна количеству живых клеток. По полученным данным строили графики зависимости выживаемости клеток от концентрации препаратов и по ним рассчитывали значения IC<sub>50</sub> для характеристики чувствительности опухолевых клеток к свободному препарату и к ПФЭ.

**Исследование выживаемости НСК после токсических воздействий с использованием сульфородамина В.** Для определения выживаемости клеток после исследуемых воздействий из лунок удаляли культуральную среду и фиксировали клетки 96%-ным этанолом при комнатной температуре. Этанол удаляли, планшет высушивали на воздухе, добавляли по 50 мкл 0,4% раствора сульфородамина В в 1%-ной уксусной кислоте и инкубировали 30 мин. Затем планшет тщательно промывали 1%-ной уксусной кислотой не менее трех раз (200 мкл/лунку) при перемешивании на шейкере и высушивали. Связавшийся с клетками краситель растворяли в 200 мкл 10 мМ незабуференного раствора ТРИС (рН 10,5) и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре с использованием фильтра 570 нм.

**Индукция дифференцировки НСК мыши.** Для исследования влияния облучения на способность выживших НСК к дифференцировке суспензию контрольных и облученных в



дозах 0,1; 1, 2 и 4 Гр культивировали в стандартных условиях в виде прикрепляющейся культуры в течение 6-7 суток. Затем клетки снимали с подложки, высевали на покрытые матригелем покровные стекла и культивировали в течение 2 суток, после чего для индукции дифференцировки НСК заменяли культуральную среду на среду без факторов роста EGF и bFGF. Каждые 2 суток половину объема среды заменяли на свежую среду без факторов. Через 6 суток культивирования в этих условиях клетки фиксировали, пермеабелизировали и проводили иммуноцитохимическое исследование присутствия маркеров нейронов ( $\beta$ -тубулин III) и астроцитов (GFAP).

**Окрашивание НСК антителами к фосфорилированному гистону  $\gamma$ H2AX** проводили через 1 час и через 24 часа после облучения. Клетки фиксировали с помощью ледяного 70% этанола и до исследования хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для флуоресцентной микроскопии клетки на стеклах промывали ФСБ, пермеабелизировали на холоду ледяным метанолом, затем промывали ФСБ и добавляли блокирующий буфер, а через 30 минут добавляли раствор моноклональных первичных АТ к H2AX в блокирующем буфере. Раствор первичных антител удаляли, промывали препараты блокирующим буфером и добавляли вторичные козьи антимышиные АТ, конъюгированные с Alexa Fluor 488 на 30 минут. Затем клетки промывали блокирующим буфером и окрашивали ядра с помощью красителя DAPI (4',6- диамино-2-фенилиндол, 1 мкг/мл), отмывали ФСБ и заключали в мовиол на предметные стекла. Препараты высушивали в течение ночи и анализировали флуоресценцию клеток с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager D2 с флуоресцентным модулем и камерой Axio Cam MRc5.

Для проточной цитофлуориметрии клетки ресуспендировали ФСБ, фиксировали 70% ледяным этанолом и хранили до измерения при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед исследованием клетки отмывали от этанола в растворе для блокировки, и инкубировали в блокирующем растворе с прямыми мышиными моноклональными антителами к гистону  $\gamma$ H2AX, меченными Alexa Fluor 488. Для измерения использовали не менее 300 тыс. клеток на пробу в виде суспензии в ФСБ. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD Bioscience, США).

**Исследование защитного действия антиоксидантов на НСК.** НСК облучали в культуральной среде с добавлением B27 (+B27) и темпола, либо в культуральной среде без B27 (-B 27). НСК облучали в дозах: 0, 1, 2, 4, 8 Гр. После облучения клетки переносили в 6-луночный низкоадгезивный планшет для дальнейшего культивирования в полной среде с добавлением B27 и факторов роста при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  в увлажненной

атмосфере. Через 7 суток нейросферы диссоциировали и подсчитывали количество живых клеток в камере Горяева.

**Получение и характеристика ПФЭ на основе биосовместимого биodeградируемого сополимера ПЛГА.** Получение и характеристику препарата ПФЭ проводил коллектив химиков лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины под руководством к.б.н. Е.А. Воронцова. Получение ПФЭ осуществляли методом одинарных эмульсий в системе «масло/вода» по разработанному в лаборатории методу. Содержание этопозида в ПФЭ определяли методом ВЭЖХ. Размер полученных частиц изучали методом динамического светорассеяния с использованием анализатора частиц Zetasizer Nano ZS ZEN 3600.

**Исследование противоопухолевой активности ПФЭ в сравнении с этопозидом *in vivo*** проводили с использованием модели перевиваемого лимфолейкоза мыши линии P388 в соответствии с рекомендациями по проведению доклинических исследований. Для развития солидной опухоли клетки лимфолейкоза P388 вводили подкожно в правую подлопаточную область в дозе  $10^6$  клеток на особь в 0,1 мл. Противоопухолевое действие субстанции этопозида и ПФЭ оценивали по ингибированию роста опухолей и изменению продолжительности жизни. Для определения динамики роста опухолей измеряли размеры опухоли, начиная с момента формирования солидной опухоли ( $V \geq 0,02 \text{ см}^3$ ). Объем опухоли рассчитывали по формуле:  $V = a \times b^2/2$ , где  $a$  – наибольший размер опухоли,  $b$  – наименьший размер опухоли. Степень торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле:  $\text{ТРО, \%} = (V_{\text{Контроль}} - V_{\text{Опыт}})/V_{\text{Контроль}} \times 100$ , где:  $V$  – средний объем опухоли ( $\text{см}^3$ ) в опытной и контрольной группах, соответственно, на конкретное время после прививки опухоли. Увеличение продолжительности жизни животных оценивали после завершения опыта и гибели всех животных, рассчитывая среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в группе и вычисляя показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ%) по формуле:  $\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖ}_{\text{Опыт}} - \text{СПЖ}_{\text{Контроль}})/\text{СПЖ}_{\text{Контроль}} \times 100$ .

**Приготовление среды, кондиционированной МСК, и ее характеристика.** При достижении 90% конфлюентности культур МСК-КМ, МСК-ГМ, МСК-ЖТ клеткам заменяли культуральную среду, на среду, состоящую из DMEM/F12 и 1% ФБС для экспериментов с клетками линии PC12. На следующий день, кондиционированную среду собирали, аликвотировали по 1,5 мл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Для экспериментов с НСК культуральную среду в культурах МСК заменяли на среду, состоящую из DMEM/F12 (Invitrogen), содержащей  $\text{NaHCO}_3$  2,4 мг/мл, глюкозу 0,6%; Нерес 0,5 мМ, прогестерон 60 нг/мл, путресцин 9,6 мкг/мл, инсулин 4,2 мкг/мл, трансферрин 3,8 мкг/мл, селенит натрия

1 мкг/мл, гепарин 1,8 мкг/мл. На следующий день кондиционированную среду собирали, аликвотировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Определение уровня цитокинов VEGF, HGF, IL-6, G-CSF, TGF $\beta$ , FGF и IL-10 в КС МСК проводили с помощью иммуно-ферментного анализа при использовании наборов фирмы R&D Systems в соответствии с указаниями фирмы и выражали в пг/мл.

Определение активности нейротрофинов среде, кондиционированной МСК, оценивали по ее влиянию на индукцию дифференцировки клеток линии PC12. Для этого клетки PC12 высевали в 24-луночные планшеты, предварительно покрытые коллагеном, с плотностью 25 тыс. клеток/лунку в среде для культивирования. На следующий день среду удаляли, добавляли свежую среду и индукторы (кондиционированную среду или фактор роста нервов NGF). Препараты клеток PC12 фотографировали на 1, 2 и 5 сутки после и индукции дифференцировки. Количество дифференцировавшихся под действием КС клеток подсчитывали как клетки, длина отростков которых равна или чуть больше двух диаметров клетки.

**Исследование защитного действия среды, кондиционированной МСК, после облучения НСК.** НСК высевали в 96-луночные планшеты, предварительно покрытые матригелем, в плотности 5 тыс. клеток/лунку в 100 мкл среды за сутки до эксперимента. Через 1 час после облучения в каждую лунку добавляли по 100 мкл КС МСК-ЖТ в концентрации: 50% , 25% , 10% , 5% КС и культивировали в стандартных условиях в течение 48 и 72 часов. Количество выживших клеток определяли с использованием сульфородамина В и выражали в процентах по отношению к необлученному контролю.

**Микроскопия.** Флуоресцентно-меченные клетки анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии и фотографий, сделанных при использовании микроскопа Axio Imager D2 с флуоресцентным модулем и камерой Axio Cam MRc5 (Carl Zeiss). Для фазово-контрастной прижизненной микроскопии клеточных культур и подсчета клеток в камере Горяева использовали световой инвертированный микроскоп TS-100 (Nikon, Япония) с цифровой камерой MMC-50M.

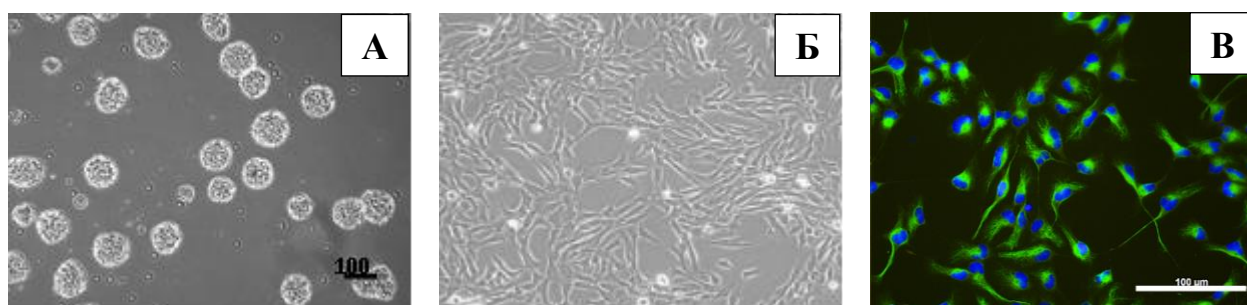
**Статистическая обработка.** Статистическую обработку результатов по методу Стьюдента и корреляционный анализ проводили с использованием компьютерной программы "Origin".

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Исследование чувствительности НСК мыши к действию $\gamma$ -излучения.

#### 1.1. Характеристика НСК мыши.

В культуре *in vitro* НСК, полученные из ткани головного мозга мыши, активно размножаются, формируя свободноплавающие колонии сферической формы, которые получили название нейросфер (Рис. 1 А). Такие культуры содержат как собственно СК, так и более быстро пролиферирующие ранние нейральные прогениторные клетки (НПК). Подчеркивая это обстоятельство, такие культуры часто обозначают как НСК/НПК. Мы сохранили обозначение таких культур как НСК. НСК также можно культивировать в виде прикрепляющейся культуры с использованием матригеля для предварительного покрытия плат (Рис. 1 Б, В).

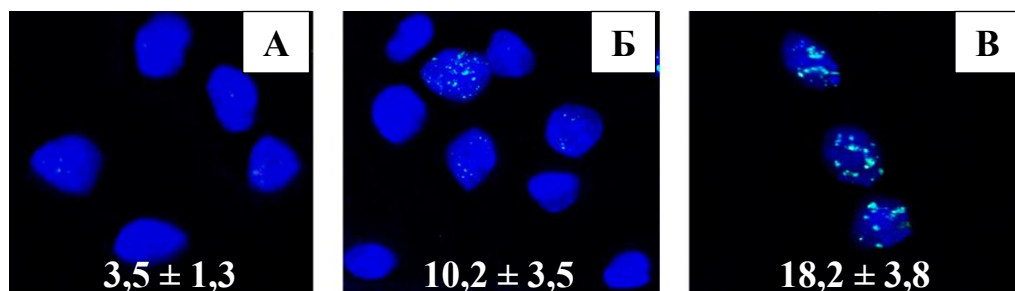


**Рис. 1.** Микрофотографии культур НСК мыши: А – культивирование в виде нейросфер, формирующихся из отдельных НСК; Б – в виде адгезионной культуры, растущей на матригеле; В - выявление нестина в НСК с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к нестину, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (зеленая флуоресценция). Ядра клеток окрашены флуоресцентным красителем DAPI (синяя флуоресценция).

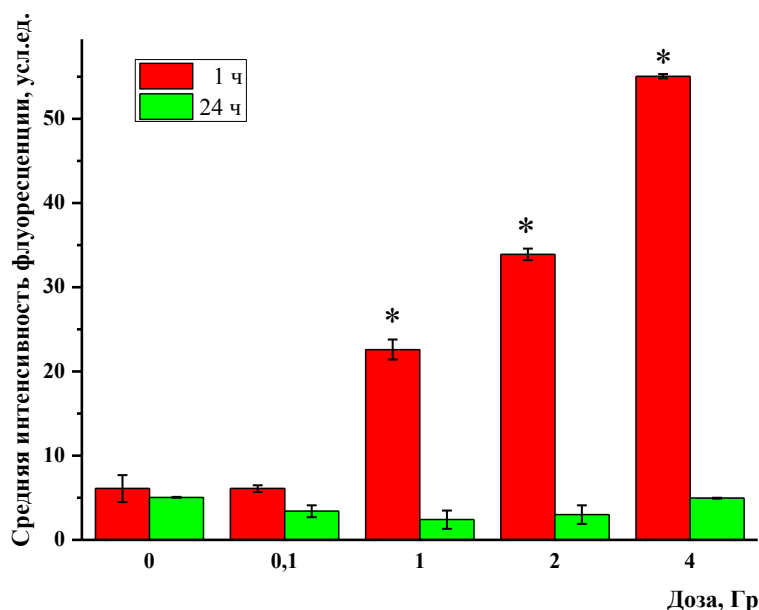
Наиболее специфическим маркером НСК является нестин. С помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии было показано, что 86 % выделенных и культивируемых *in vitro* НСК (6-9 пассаж) являются нестин-положительными (Рис. 1 В). Показано, что в общей популяции НСК присутствует небольшое количество клеток, содержащих маркеры астроцитов (GFAP) -  $4,8 \pm 1,5\%$ , нейронов ( $\beta$ -тубулин III) -  $4,0 \pm 1,5\%$ , олигодендроцитов (O4) -  $4,1 \pm 1,5\%$ , предшественников олигодендроцитов (NG2) -  $1,3 \pm 0,5\%$  и маркер нейральных прогениторных клеток, белок плазматической мембраны СК - проминин-1 (CD133) -  $2,6 \pm 0,5\%$ . Таким образом, в полученных препаратах НСК мыши около 90% клеток, экспрессируют нестин, что соответствует фенотипу НСК.

## 1.2. Анализ образования и репарации двуниевых разрывов ДНК, регистрируемых по уровню гистона $\gamma$ H2AX в НСК после облучения

Использованный нами метод анализа количества двуниевых разрывов (ДР) ДНК после облучения НСК основан на детектировании фосфорилированного гистона  $\gamma$ H2AX. НСК в виде прикрепляющихся культур на покровных стеклах облучали в различных дозах и фиксировали через 1 ч и через 24 ч культивирования после облучения. Фокусы гистона  $\gamma$ H2AX, образующиеся через 1 час после действия  $\gamma$ -излучения в ядрах контрольных и облученных клеток, показаны на Рис. 2.



**Рис. 2.** Фокусы гистона  $\gamma$ H2AX в НСК через 1 час после действия гамма-излучения. А - контрольные клетки, Б - облучение в дозе 0,1 Гр; В - в дозе 1 Гр. Цифрами показано среднее число фокусов на ядро.



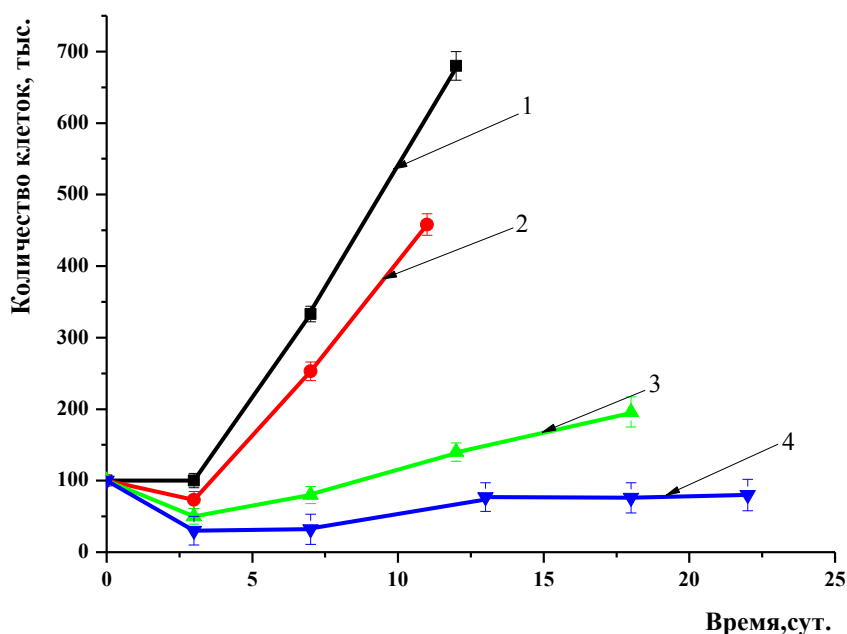
**Рис. 3.** Влияние облучения на уровень гистона  $\gamma$ H2AX в НСК через 1 и 24 часа после облучения в дозах 0; 0,1; 1; 2; 4 Гр. Данные проточной цитометрии. \* - отличия от контроля достоверны,  $p < 0,05$ .

Количественный анализ содержания гистона  $\gamma$ H2AX в НСК через 1 и 24 часа после облучения в дозах 0,1 – 4 Гр проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты, представленные на Рис. 3, свидетельствуют о дозо-зависимом

увеличении ДР ДНК после облучения и репарации их основного количества в НСК через 24 часа после облучения в указанном диапазоне доз.

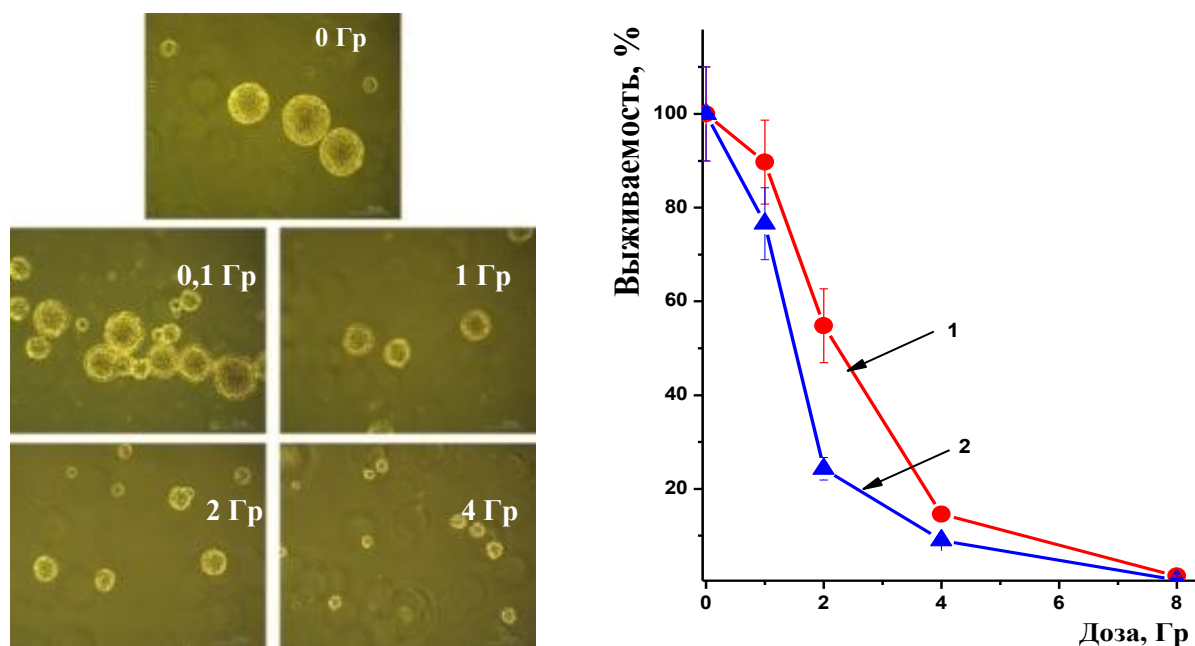
### 1.3. Изучение зависимости выживаемости НСК мыши от дозы $\gamma$ -излучения

Для анализа количества НСК при изучении их устойчивости к ионизирующему излучению применяли прямой подсчет клеток в камере Горяева после диссоциации нейросфер с помощью аккутазы и подсчет количества нейросфер. Количество нейросфер отражает количество собственно стволовых клеток, в то время как при подсчете клеток учитываются как собственно стволовые клетки, так и прогениторные клетки – быстро делящиеся клетки, коммитированные к дифференцировке. Обнаружено снижение количества клеток в культуре уже после облучения НСК в дозе 1,0 Гр. При более высоких дозах (2 - 4 Гр) снижение количества НСК было более глубоким, и скорость прироста клеток была существенно снижена (Рис. 4 и 5).



**Рис. 4.** Влияние облучения на количество НСК в культуре в зависимости от дозы и времени после действия  $\gamma$ -излучения: 1 - контроль; 2 - 1 Гр; 3 - 2 Гр; 4 - 4 Гр. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева.

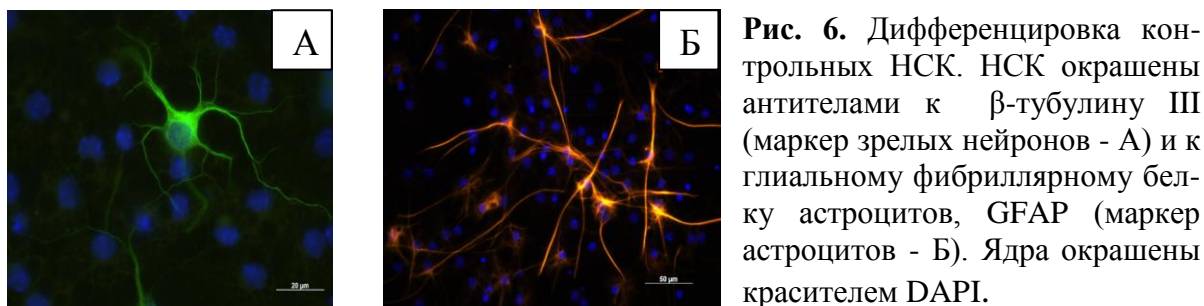
Представленные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности НСК к действию излучения: количество клеток снижалось на 22% уже после облучения в дозе 1 Гр (Рис. 5Б, кривая 2). При дозах 2, 4 и 8 Гр количество клеток в культуре на 7 сутки после облучения составляло соответственно 22; 9 и 1% от контроля. Количество нейросфер снижалось на 11% после облучения в дозе 1 Гр (Рис. 5Б, кривая 1) и при дозах 2, 4 и 8 Гр их количество составляло соответственно 54,8; 14,6 и 1,4% от контроля. При облучении НСК наблюдалась хорошо выраженная зависимость снижения не только количества, но и размера нейросфер от дозы облучения (Рис.5А). Высокая радиочувствительность НСК мыши, проявляющаяся в снижении жизнеспособности



**Рис. 5.** Дозовая зависимость изменения размера (А) и количества нейросфер (Б, кривая 1) и количества клеток (Б, кривая 2) через 7 суток после облучения. А - микрофотографии нейросфер в культуре клеток. облученных НСК и их клоногенной активности, оцениваемой по количеству нейросфер, может сопровождаться и нарушениями в дифференцировке НСК, выживших после облучения.

#### 1.4. Исследование влияния облучения на способность НСК к дифференцировке

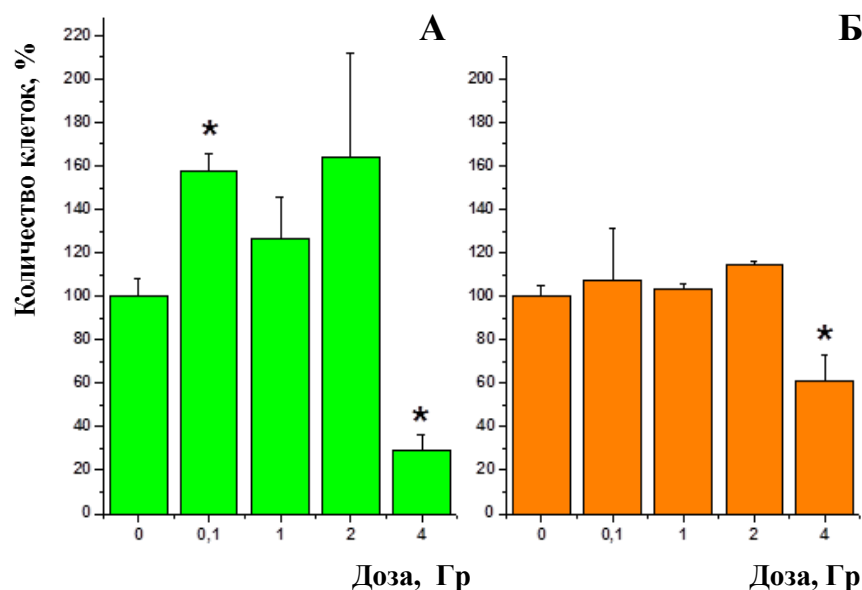
Для исследования способности облученных НСК к дифференцировке суспензию НСК облучали в дозах 0,1; 1, 2 и 4 Гр. Полученные результаты представлены на Рис. 6, 7.



**Рис. 6.** Дифференцировка контрольных НСК. НСК окрашены антителами к  $\beta$ -тубулину III (маркер зрелых нейронов - А) и к глиальному фибриллярному белку астроцитов, GFAP (маркер астроцитов - Б). Ядра окрашены красителем DAPI.

В контрольных культурах при дифференцировке НСК в выбранных условиях в нейроны дифференцировалось 5% клеток, а в астроциты - 17% клеток. Обнаружена стимуляция дифференцировки НСК в нейроны после облучения НСК в дозе 0,1 Гр. После облучения НСК в дозе 4 Гр количество дифференцированных нейронов было снижено на 60% (Рис.7 А). НСК, пережившие облучение в дозах 1 и 2 Гр, сохраняли способность к дифференцировке в нейроны (Рис.7 А). Показано, что способность НСК к дифференцировке в астроциты после облучения в этом диапазоне доз снижалась также

только при облучении клеток в дозе 4 Гр: количество астроцитов, образующихся из НСК, облученных в дозе 4 Гр было снижено на 20% по сравнению с контролем (Рис. 7 Б).



**Рис.7.** Дифференцировка НСК мыши, выживших после действия  $\gamma$ -излучения, в нейроны (А) и астроциты (Б). Дифференцировку индуцировали через 8 сут после облучения удалением из культуральной среды факторов роста. Фиксация клеток через 6 суток после индукции дифференцировки. \* - отличия от контроля достоверны,  $p < 0,05$ .

Следует подчеркнуть, что учитывая снижение количества НСК после облучения уже в дозах 1 и, особенно, 2 Гр (Рис. 5), такое воздействие приведет к снижению образования и нейронов, и астроцитов, несмотря на сохранение способности НСК к дифференцировке. Важно отметить также более высокую радиочувствительность процесса дифференцировки НСК в нейроны.

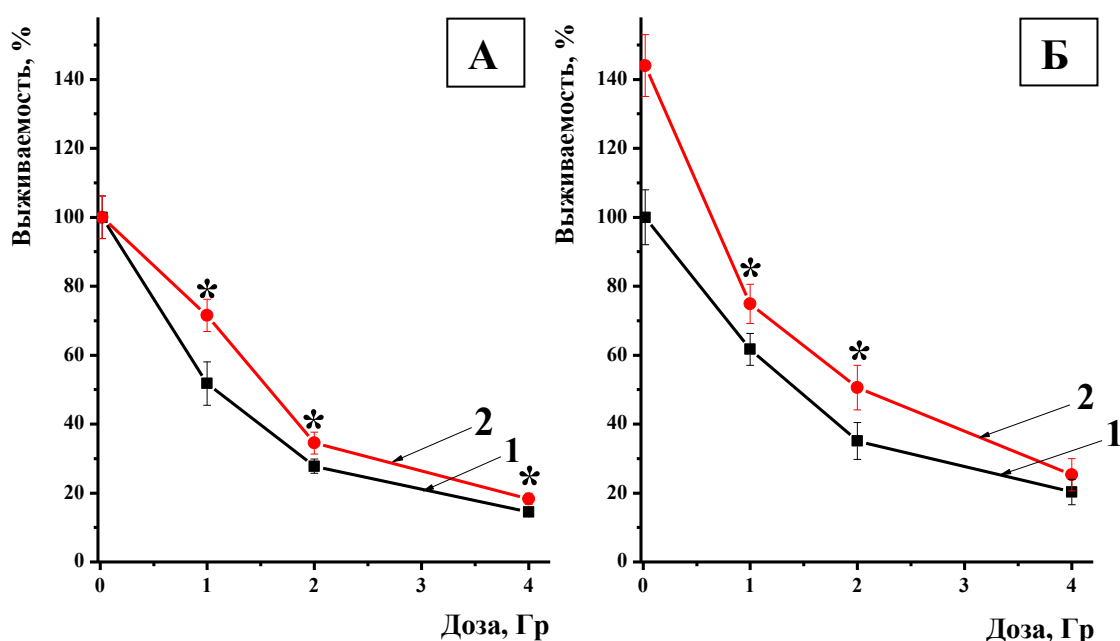
### 1.5. Исследование радиозащитного действия антиоксидантов на развитие радиационных повреждений НСК *in vitro*

В состав культуральной среды НСК входит комплекс антиоксидантов – добавка В27. Поэтому в специальных экспериментах была исследована эффективность защитного действия этого комплекса при облучении НСК. Показано, что комплекс В27 обладал радиозащитным действием только при низкой дозе облучения - 1 Гр.

Радиозащитным действием обладает хорошо изученный препарат Темпол. Известно, что Темпол при облучении проявляет защитное действие *in vitro* только в концентрациях 50 - 200 мМ. Поэтому в предварительных экспериментах были подобраны нетоксичные для НСК концентрации этого препарата и условия для изучения его нейропротекторной активности в отношении НСК без комплекса В27 и в его присутствии. Было показано, что в концентрациях  $> 60$  мкМ Темпол токсичен для НСК при инкубации в течение 72 ч. При снижении времени инкубации НСК с Темполом до 24 ч (с последующим культивированием НСК в среде без темпола еще в течение 48 ч) клетки



хорошо переносят Темпол в концентрациях ниже 150 мкМ. Поэтому действие Темпола на НСК при облучении исследовали, используя препарат в концентрации 100 мкМ, при его добавлении за 1 час до облучения и последующей инкубации НСК в его присутствии в течение 2 часов. Показано, что Темпол обладает более высокой эффективностью при защите НСК от действия излучения, чем комплекс В27 – он более эффективен при дозе 1 Гр, эффективен при дозе 2 Гр, и даже при 4 Гр имеет место защитное действие (Рис. 8А). Наиболее высокая защитная активность наблюдается при совместном использовании комплекса В27 и Темпола (Рис. 8Б). Таким образом, показано, что исследованные антиоксиданты обладают нейропротекторной активностью в защите НСК при действии  $\gamma$ -излучения, но только в диапазоне сублетальных доз.



**Рис. 8.** Влияние Темпола на выживаемость НСК при облучении и культивировании без (А) и в присутствии комплекса В27 (Б). 1- контрольные облученные НСК; 2- инкубация с Темполом 1 ч до и 2 ч после облучения. Культивирование клеток в течение 72 часов. \* - отличия от облученных проб достоверны,  $p < 0,05$ .

## 2. Исследование противоопухолевой активности полимерной формы этопозиды в сравнении с действием свободного этопозиды

Для исследования цитотоксической активности ПФЭ в отношении различных клеток *in vitro* в сравнении со свободным этопозидом использовали семь линий опухолевых клеток, линию нормальных клеток человека и две линии клеток мыши. Показано, что ПФЭ обладает высокой цитотоксической активностью в отношении широкого спектра опухолевых клеток разных типов, включая клетки линии K562<sup>ADR</sup>, характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью (таблица 1).

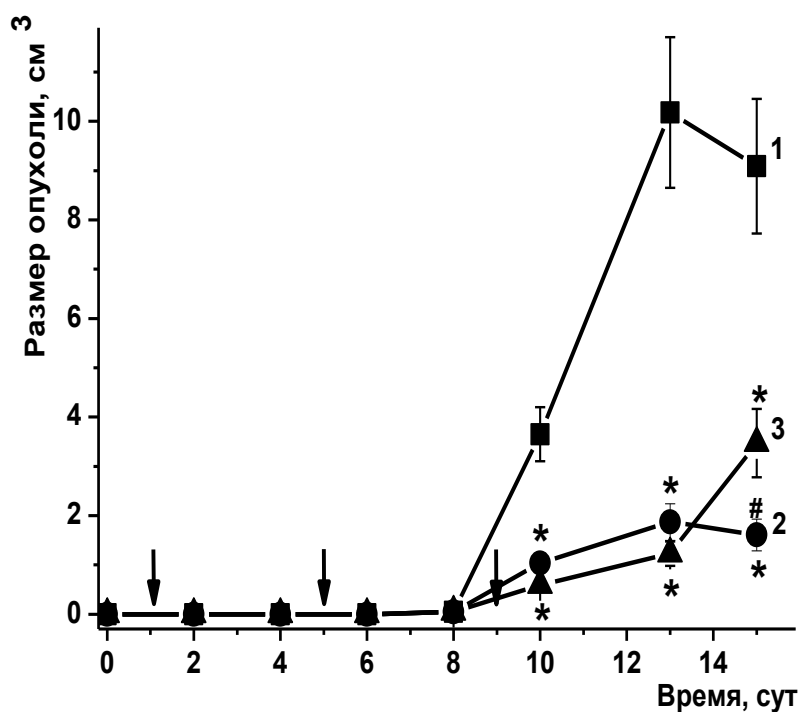
Таблица 1.

Характеристика цитотоксической активности ПФЭ в сравнении со свободным этопозидом в отношении опухолевых клеток человека и мыши в сравнении с линией нормальных клеток. Приведены средние значения  $IC_{50}$  и стандартная ошибка среднего.

Линия клеток	Значение $IC_{50}$ , мкМ	
	Этопозид	Полимерная форма этопозиды
Аденокарцинома молочной железы, линия MCF-7	$40,9 \pm 3,2^{\wedge}$	$22,0 \pm 7,8$
Аденокарцинома прямой кишки, линия SW837	$78,0 \pm 9,4^{\wedge}$	$39,0 \pm 5,2^{*\wedge}$
Аденокарцинома ободочной кишки, линия Caco-2	$10,0 \pm 2,5$	$9,5 \pm 1,8^{\wedge}$
Карцинома сигмовидной кишки, линия Colo 320HSR	$20,0 \pm 1,9$	$6,5 \pm 1,8^{*\wedge}$
Миелолейкоз, линия K562	$22,0 \pm 0,5$	$32,1 \pm 5,8$
Миелолейкоз, резистентная к адриамицину сублиния K562 <sup>ADR</sup>	$74,3 \pm 8,7^{\wedge}$	$32,2 \pm 5,4^*$
Лимфолейкоз мыши линии P388	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Нейробластома мыши, Neuro-2a	$8,6 \pm 1,0$	$12,5 \pm 2,4$
Легочные эмбриональные фибробласты, линия LECN-4	$20,7 \pm 6,4$	$18,0 \pm 2,8$

\* - отличия между субстанцией этопозиды и ПФЭ достоверны,  $p < 0,05$ ;

$\wedge$  - отличия от неопухолевых клеток человека достоверны,  $p < 0,05$ .



**Рис. 9.** Динамика роста солидной опухоли лимфолейкоза мыши линии P388 после лечения препаратами ПФЭ и в виде свободного этопозиды. Приведены средние значения размера опухоли и стандартное отклонение. Препараты вводили в/б в дозе 25 мг/кг по этопозиду на 1, 5 и 9 сутки после прививки опухоли, суммарная доза 75 мг/кг. 1 - контроль - физиологический раствор, 2 - ПФЭ, 3 - свободный этопозид. \* - отличия от контроля достоверны ( $p < 0,05$ ); # - отличия между группами 2 и 3 достоверны ( $p < 0,05$ ).

Для исследования противоопухолевой активности ПФЭ в сравнении со свободным этопозидом *in vivo* препараты вводили мышам внутривентриально в суммарной дозе 75 мг/кг при трехкратном введении на 1, 5 и 9 сутки после прививки опухолевых клеток в разовой дозе 25 мг/кг по этопозиду. Полученные результаты представлены на Рис.9. Представленные данные позволяют заключить, что при введении мышам как ПФЭ, так и свободного этопозид в указанных дозах достигается существенное ингибирование роста опухолей. При использовании ПФЭ эффект ингибирования был более длительным. Полученные данные свидетельствуют о пролонгировании противоопухолевого действия при использовании ПФЭ, что в свою очередь обеспечило и УПЖ животных, получавших ПФЭ, до 31,8% по сравнению с 23,1% для животных, получавших свободный этопозид (таблица 2).

**Таблица 2.**

**Показатели противоопухолевой активности ПФЭ в сравнении со свободным этопозидом в модели перевиваемого лимфолейкоза мышей линии P388.** Препараты вводили в дозе 25 мг/кг по этопозиду на 1, 5 и 9 сутки после прививки опухоли, суммарная доза 75 мг/кг. Данные по ТРО приведены на 7 сутки после отмены препаратов.

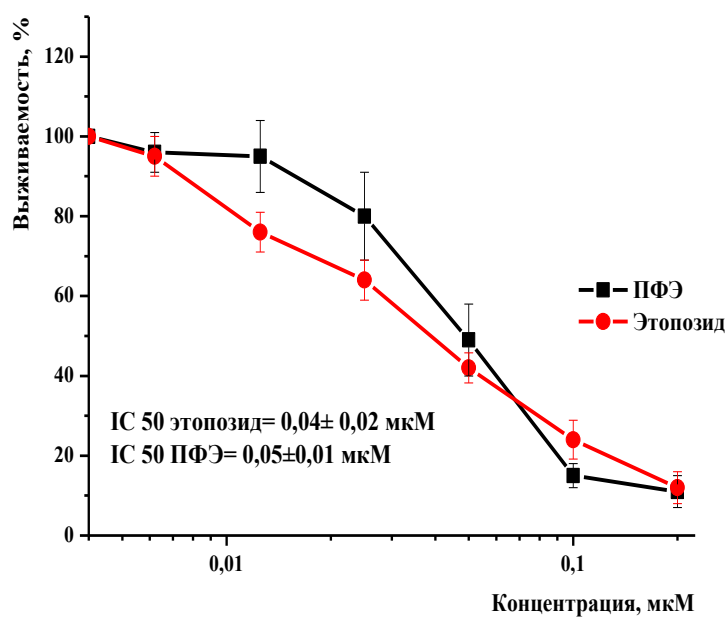
Группа животных	ТРО, %	СПЖ, сутки	УПЖ, %
Контроль	-	19,5± 2,8	-
ПФЭ	88,2	25,7± 5,0	31,8
Свободный этопозид	75,0	24,0± 3,8	23,1

Таким образом, как показано в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, ПФЭ обладает высокой противоопухолевой активностью, и после проведения более широких доклинических исследований препарат ПФЭ может быть рекомендован для проведения клинических испытаний. Поэтому важно оценить его возможную токсичность в отношении НСК в сравнении с действием свободного этопозид.

### **2.3. Изучение токсичности свободной и полимерной формы этопозид в отношении НСК**

Цитотоксическую активность свободной и полимерной формы этопозид в отношении НСК *in vitro* оценивали по изменению выживаемости НСК после их культивирования в присутствии этих препаратов по значению IC<sub>50</sub>.

Зависимость выживаемости НСК от концентрации этопозид и ПФЭ показана на рисунке 10. Как следует из представленных данных, токсичность ПФЭ в отношении НСК не превышает токсичности свободного этопозид. В тоже время необходимо отметить высокую чувствительность НСК к этим препаратам.



**Рис. 10.** Влияние этопозида и ПФЭ на выживаемость НСК. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего.

### 3. Изучение нейропротекторной активности факторов, секретируемых МСК

#### 3.1. Исследование активности нейротрофинов в среде, кондиционированной МСК из разных тканей мышцы

Исследование активности нейротрофинов, секретируемых МСК из разных тканей мышцы, проводили с использованием в качестве модели клеток феохромоцитомы крысы линии PC12 по оценке стимуляции дифференцировки клеток PC12, при которой изменяется их морфология: клетки вытягиваются, образуются биполярные отростки, длина которых увеличивается в динамике культивирования. Для индукции дифференцировки клетки PC12 высевали в 24-х луночные планшеты, через 24 часа и далее ежедневно меняли среду на КС МСК. В качестве положительного контроля использовали фактор роста нервов - NGF. Полученные результаты представлены в таблице 5 и из них следует, что КС, полученная при культивировании МСК из разных тканей мышцы (МСК-КМ, МСК-ГМ и МСК-ЖТ), обладает активностью нейротрофинов.

**Таблица 3.** Дифференцировка клеток линии PC12 под действием кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК из разных тканей мышцы.

Кондиционированная среда	Доля дифференцированных клеток, %		
	1 сутки	2 сутки	5 сутки
МСК-КМ	16,4	15,7	9,7
МСК- ГМ	10,0	15,2	7,0
МСК-ЖТ	9,7	15,3	55,6
NGF 6,2 нг/мл	28,3	-	96,3
NGF 12,5 нг/мл	27,4	-	92,8
NGF 50 нг/мл	25,8	-	96,5
Контроль	0	0	1,6

Наиболее высокая активность, сравнимая с действием NGF, обнаружена при использовании МСК-ЖТ, поэтому в дальнейших экспериментах для исследования нейропротекторной активности факторов, секретируемых МСК, использовали среду, кондиционированную МСК-ЖТ. В этой среде, кроме того, при исследовании уровня цитокинов с помощью иммуноферментного анализа, обнаружена высокая концентрация цитокинов VEGF, HGF, IL-6 и TGF- $\beta$ , которая составила  $397\pm 50$ ,  $2486\pm 100$ ,  $67\pm 10$  и  $27\pm 8$  пг/мл, соответственно. Цитокины G-CSF, FGF и IL-10 в КС МСК-ЖТ не обнаружены.

### **3.2. Изучение нейропротекторной активности факторов, секретируемых МСК из жировой ткани мыши, на НСК при действии $\gamma$ -излучения**

В предварительных экспериментах было показано, что при инкубации НСК с КС МСК-ЖТ в течение 48-72 часов КС практически не влияет на количество контрольных НСК, или повышает их жизнеспособность, что приводит к небольшому повышению количества клеток. При микроскопии не было замечено существенных отличий по морфологии НСК от клеток, которые культивировали без добавления КС. Поэтому эти условия были выбраны для изучения защитного действия КС в отношении НСК при действии  $\gamma$ -излучения и при действии этопозида и ПФЭ.

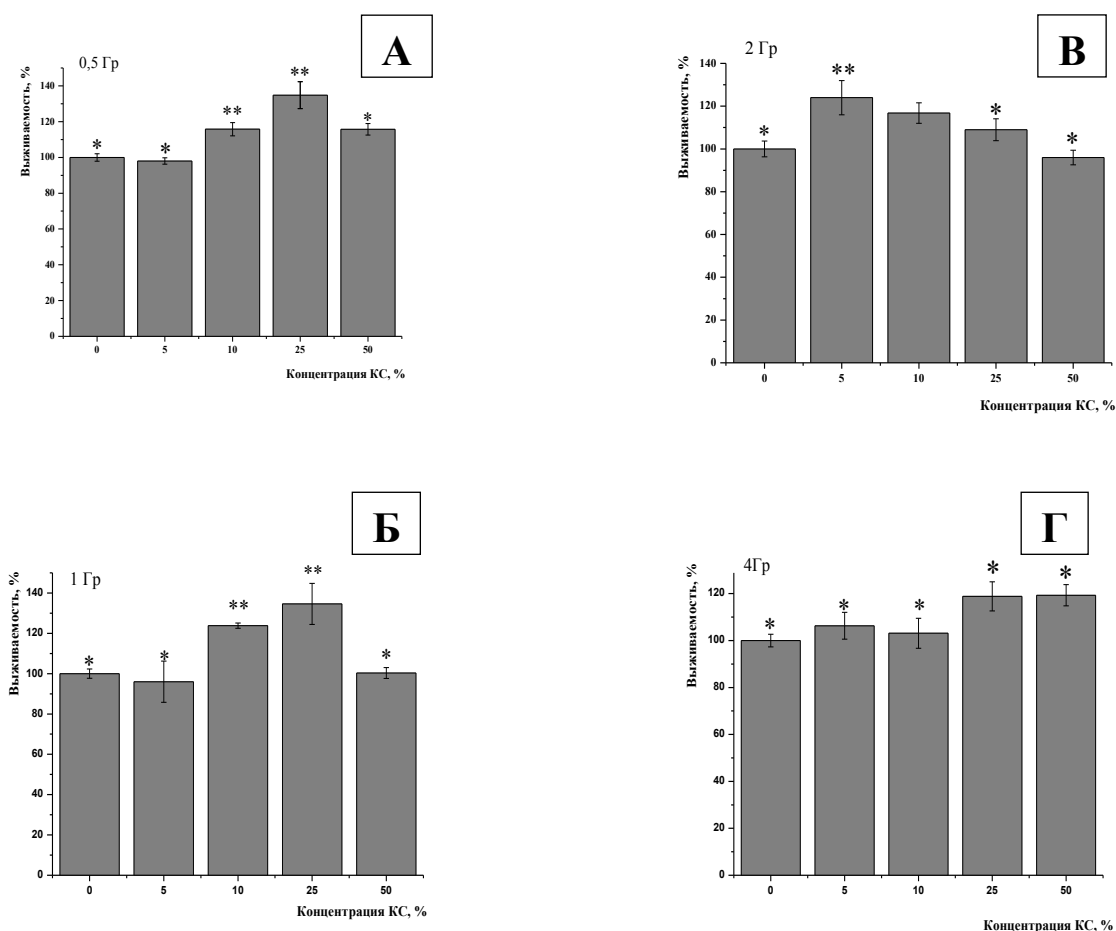
Показано (Рис.11), что в выбранных условиях эксперимента при добавлении КС МСК-ЖТ через 1 час после облучения НСК, наблюдается эффективная защита НСК, облученных в дозах 0,5 и 1 Гр, при концентрации КС 10 и 25%. Полученные результаты являются основой для разработки оптимальных способов использования КС МСК для защиты НСК при действии облучения.

### **3.3. Изучение нейропротекторной активности факторов, секретируемых МСК из жировой ткани мыши, на НСК при действии этопозида и ПФЭ**

При выборе условий для изучения нейропротекторной активности факторов, секретируемых МСК-ЖТ на НСК при действии этопозида в свободной и полимерной форме оценивали выживаемость НСК. Целью экспериментов был выбор оптимальной концентрации КС, при которой наблюдается наиболее высокий защитный эффект. Полученные результаты представлены в таблице 4.

При исследовании влияния КС на НСК, обработанные этопозидом, показано (таблица 4), что КС на 20-25% повышает жизнеспособность контрольных НСК при всех концентрациях этопозида, но эти отличия статистически малозначимы. Защитное действие КС становилось существенным при высоких концентрациях этопозида порядка 0,025-0,05 мкМ, когда выживаемость клеток снижалась до 13,2-36,7%. При этом наиболее

эффективная защита, также, как и при действии  $\gamma$ -излучения, наблюдалась тогда, когда концентрация КС составляла 25% в составе культуральной среды НСК.



**Рис. 11.** Влияние кондиционированной среды МСК-ЖТ на выживаемость НСК после действия  $\gamma$ -излучения в дозах 0,5 Гр (А); 1 (Б); 2 (В) и 4 Гр (Г). Представлены средние значения  $\pm$  ошибка среднего. За 100% принята выживаемость клеток при указанной дозе. \* - снижение выживаемости по сравнению с необлученным контролем достоверно,  $p < 0,05$ ; \*\* - отличия от облученного контроля достоверны,  $p < 0,05$ .

**Таблица 4. Защитное действия КС МСК-ЖТ на НСК, обработанные этопозидом.** Данные одного из трех типичных экспериментов. Представлены средние значения  $\pm$  ошибка среднего. \* - отличия от контроля достоверны,  $p < 0,05$ . \*\* - отличия от образцов, обработанных этопозидом, достоверны,  $p < 0,05$ .

Концентрация КС МСК-ЖТ, %	Выживаемость НСК в присутствии этопозида, %				
	Концентрации этопозида, мкМ				
	0	0,006	0,012	0,025	0,05
0	100,0 $\pm$ 16,1	78,8 $\pm$ 11,0	64,2 $\pm$ 18,9	36,7 $\pm$ 6,2*	13,2 $\pm$ 0,3*
5	125,3 $\pm$ 10,8	160,7 $\pm$ 36,7	106,5 $\pm$ 23,8	59,8 $\pm$ 16,0	65,6 $\pm$ 23,7**
10	120,7 $\pm$ 15,3	91,0 $\pm$ 4,2	76,3 $\pm$ 7,2	84,2 $\pm$ 31,6	76,2 $\pm$ 7,2**
25	119,5 $\pm$ 16,8	94,6 $\pm$ 3,3	116,7 $\pm$ 4,0**	84,8 $\pm$ 18,6**	101,8 $\pm$ 18,6**

Таким образом, обнаружено, что КС МСК-ЖТ оказывает нейропротекторное действие как после облучения НСК, так и после действия этопозида в свободной и полимерной форме. Эффективность защитного действия зависит от степени повреждения клеток. Она была наиболее высокой при дозах облучения до 2 Гр включительно. При действии этопозида защитный эффект наблюдался и при относительно высоких дозах препарата, снижавших выживаемость НСК до 13-16%. Полученные результаты по изучению нейропротекторного действия комплекса факторов, секретируемых МСК, являются основой для дальнейших исследований в этой области.

#### **4. Выводы**

1. Обнаружена способность НСК мышцы к репарации ДР ДНК, оцениваемых по уровню гистона  $\gamma$ H2AX, после действия  $\gamma$ -излучения в дозах 1- 4 Гр.
2. Показана высокая радиочувствительность НСК к действию  $\gamma$ -излучения и радиозащитная активность антиоксиданта темпол и комплекса В27 в отношении НСК.
3. Выявлена стимуляция дифференцировки НСК в нейроны после облучения в дозе 0,1 Гр; дифференцировка НСК в астроциты при этой дозе не изменялась.
4. Обнаружено снижение способности к дифференцировке у выживших после облучения в дозе 4 Гр НСК, которое было более глубоким при дифференцировке в нейроны, чем при дифференцировке в астроциты.
5. Показана высокая противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo* и пролонгированное действие у разработанного инновационного препарата этопозида в полимерной форме.
6. В культуральной среде, кондиционированной МСК из жировой ткани мышцы, обнаружена высокая активность нейротрофинов и высокое содержание цитокинов IL6, HGF, TGF $\beta$  и VEGF.
7. Обнаружена нейропротекторная активность факторов, секретируемых МСК из жировой ткани мышцы, при защите НСК от таких токсических воздействий, как  $\gamma$ -излучение и противоопухолевый препарат этопозид в обычной и полимерной форме.

#### **Список печатных работ по теме диссертации, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и тезисов конференций**

1. Посыпанова Г.А., Москалева Е.Ю., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Ратушняк М.Г., Перевозчикова В.Г. Действие малых и сублетальных доз  $\gamma$ -излучения на мезенхимальные и нейральные стволовые клетки из головного мозга мыши.// Радиационная биология. Радиозоология. 2016, том 56, № 1, стр. 35-43.
2. Посыпанова Г.А., Горшкова Л.Б., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Перевозчикова В.Г., Москалева Е.Ю., Ратушняк М.Г., Воронцов Е.А., Кузнецов С.Л., Тубашева И.А., Муравьева А.И., Северин С.Е. Характеристика противоопухолевой активности

- полимерной формы этопозиды в составе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот. // Химико-фармацевтический журнал. 2016, том 50, №8, стр.45-50.
3. Ратушняк М.Г., Северин С.Е. Роль цитокинов, секретируемых мезенхимальными стволовыми клетками, в стимуляции процессов регенерации мозга. Молекулярная медицина. 2017, том 15, № 1, стр. 10-14.
  4. Ратушняк М.Г. Анализ радиочувствительности нейральных стволовых клеток. Сборник аннотаций. XIII Курчатовская молодежная научная школа. НИЦ «Курчатовский институт». 2015 г. С. 81.
  5. Ратушняк М.Г., А.И. Муравьева, Ю.П. Семочкина, В.Г. Перевозчикова. Характеристика противоопухолевой активности полимерной формы этопозиды в составе биodeградируемого сополимеромолочной и гликолевой кислот. Ломоносов–2016: Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология»; МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Тезисы докладов. Москва, 11-15 апреля 2016 г. С. 67-68.
  6. Абишева А.А., Ратушняк М.Г. Исследование влияния действия  $\gamma$ -излучения на пролиферацию и дифференцировку нейральных стволовых клеток мыши. Сборник Аннотаций XIV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа. НИЦ «Курчатовский институт». 2016 г. С.60.
  7. Высоцкая О.В., Ратушняк М.Г. Факторы, секретируемые мезенхимальными стволовыми клетками, повышают выживаемость нейральных стволовых клеток при действии  $\gamma$ -излучения. Сборник Аннотаций. XIV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа. НИЦ «Курчатовский институт». 2016, С.93.
  8. Posyanova G. A., Ratushnyak M.G., Abisheva A. A., Semochkina Y. P., Moskaleva E. Yu. DNA double-strand breaks measured by the level of histone  $\gamma$ H2AX in mouse neural stem cells after  $\gamma$ -irradiation at low and sublethal doses. 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Radiation research Society. 17-21<sup>st</sup>. 09. 2017, Essen, Germany. Abstract Boock. P. 379.



**Ратушняк Мария Григорьевна (РФ)**  
**«Исследование действия нейропротекторов**  
**на нейрональные стволовые клетки после радиационного и химического**  
**повреждения»**

Повреждение мозга при лучевой и химиотерапии в значительной мере определяется нарушением нейрогенеза в субгранулярной зоне зубчатой извилины в гиппокампе в результате повреждения нейральных стволовых клеток (НСК). Для снижения неспецифической токсичности противоопухолевых препаратов и пролонгирования их действия разрабатываются технологии получения полимерных форм таких лекарств путем включения препаратов в полимерные частицы субмикронных размеров. Целью настоящей работы явилось изучение чувствительности НСК мыши к действию  $\gamma$ -излучения и противоопухолевого препарата этопозид в свободной и в полимерной форме (ПФЭ) и поиск способов защиты НСК от действия радиационных и химических генотоксических факторов. В работе охарактеризована радиочувствительность НСК мыши, культивируемых *in vitro* в виде нейросфер и в виде прикрепляющихся клеток при действии  $\gamma$ -излучения. Обнаружено защитное действие антиоксиданта темпол при облучении НСК. Впервые показано, что в НСК происходит эффективная репарация двунитевых разрывов ДНК, оцениваемых по уровню гистона  $\gamma$ H2AX. С использованием иммуноцитохимических методов обнаружена стимуляция дифференцировки НСК в нейроны при действии дозы 0,1 Гр и снижение их дифференцировки в нейроны и астроциты после облучения в дозе 4 Гр. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана высокая противоопухолевая активность и пролонгирование действия этопозид в виде ПФЭ. Токсичность ПФЭ в отношении НСК не превышала токсичность свободного этопозид. Обнаружено, что комплекс факторов, секретируемых МСК из жировой ткани, обладает нейропротекторной активностью в отношении НСК и защищает их от цитотоксического действия  $\gamma$ -излучения и этопозид.

**Ratushnyak Maria Grigorievna (RF)**  
**«Investigation of the neuroprotectors effects on neural stem cells after irradiation and**  
**chemical damage»**

Brain injury induced during radiotherapy and chemotherapy is largely dependent on a disruption of neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus in the hippocampus as a result of the neural stem cells (NSC) damage. To reduce the nonspecific toxicity of antitumor drugs and prolong their action, new technologies are being developed to incorporate active substances in polymeric particles of submicron sizes. The aim of this work was to study the sensitivity of the mouse NSC to  $\gamma$ -radiation and to anticancer drug etoposide in usual and polymeric form (PFE) and to search for approaches to protect NSC against radiation and chemical genotoxic factors. In this study, we characterized the radiosensitivity of mouse NSC cultured *in vitro* as neurospheres or as attached cells. The protective effect of the antioxidant tempol was detected on  $\gamma$ - irradiation of the NSC. For the first time, it was shown that NSC can effectively repair DNA double-strand breaks, which were measured on the level of histone  $\gamma$ H2AX. Using immunocytochemical methods, the stimulation of NSC differentiation into neurons at a dose of 0.1 Gy and lowering their differentiation into neurons and astrocytes after irradiation at a dose of 4 Gy was shown. The high antitumor activity and prolongation of the effect of etoposide in the form of PFE were shown *in vitro* and *in vivo*. The toxicity of PFE against NSC did not exceed the toxicity of free etoposide. It was found that the complex of factors secreted by MSC from adipose tissue possesses neuroprotective activity on NSC and protects them from the cytotoxic effects of  $\gamma$ -radiation and etoposide.