ПРЕСНОВОДНЫЕ ПЛОСКИЕ ЧЕРВИ ПЛАНАРИИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМА И РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Трунова А.В.

г.Пущино, МБОУ Гимназия «Пущино», 11 класс

Научный руководитель: Ермаков А.М., г.Пущино, ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Данная статья является реферативным изложением основной работы. Полный текст научной работы, приложения, иллюстрации и иные дополнительные материалы доступны на сайте II Международного конкурса научно – исследовательских и творческих работ учащихся «Старт в науке» по ссылке: https://www. school – science. ru/2017/1/27546

Ионизирующие излучения обладают высокой биологической активностью. В силу того, что данный тип излучений обладает очень высокими энергиями квантов, они способны взаимодействовать с веществом [1]. Первичное действие таких излучений на организм может быть непосредственным (прямым) и косвенным. Прямое действие вызывает ионизацию атомов и молекул, образование ионов, возникновение возбужденных атомов, появление радикалов. Активные молекулы и обломки молекул индуцируют различные химические реакции, повреждая комплексы клеток. Косвенное действие излучений заключается в том, что образованные радикалы воды и пероксиды вступают в химические реакции с молекулами белков, липидов и т. д. и приводят к структурным изменениям тканей и клеток [2].

При облучении биологической ткани ионизирующими излучениями схематично все процессы можно выразить следующим образом: физический этап (поглощение энергии), физико – химический этап (возбуждение атомов или их ионизация), химический этап (образование свободных радикалов), биомолекулярные повреждения (изменения молекул белков, нуклеиновых кислот), биологические и физиологические изменения в организме. Вслед за поглощением энергии ионизирующего излучения, сопровождаемым физическими изменениями клеток, происходят процессы химического и биологического характера, которые закономерно приводят, прежде всего, к повреждению жизненно важных биомолекул в клетке [3].

Для клетки может оказаться губительным даже воздействие ничтожно малых доз ионизирующего излучения. В первую очередь, из – за высокой степени подверженности повреждениям надмолекулярных структур, вследствие оказываемого на них радиационного эффекта с химическим, физическим или биохимическим усилением. В результате воздействия изменяются физико – химические свойства ДНК, происходят разрывы хромосом, хромосомные аберрации и точковые мутации, сопровождаемые образованием белков, утративших свою обычную биологическую активность [3].

Ионизирующие излучения могут иметь как техногенное происхождение при авариях на ядерных объектах, так и используются для лучевой терапии онкологических заболеваний. Поэтому постоянно ведутся разработки новых методов и веществ для радиопротекции с целью минимизировать вред организму, причиняемый этими излучениями. Радиопротекторы – это вещества, способные нейтрализовать негативное влияние ионизирующего излучения на биологические молекулы и, следовательно, на клетки и ткани в целом [4]. Как уже было сказано выше – кванты излучения ионизируют молекулы напрямую и приводят к образованию свободных радикалов, которые в последствии и разрушают биологические молекулы. Основное действие радиопротектора заключается в том, что за счет наличия восстановленных атомов в составе молекулы это вещество восстанавливает ионы и свободные радикалы, подавляя, таким образом, цепные свободнорадикальные процессы и нейтрализуя радикалы [3].

Таким образом, остается актуальным вопрос о разработке новых моделей для скрининга радиопротекторных свойств тех или иных веществ. Подобной моделью могут служить пресноводные плоские черви – планарии, обладающие уникальной способно-

стью к регенерации за счет стволовых клеток необластов [5]. Необласты планарий – единственные клетки животных, которые во взрослом организме делятся и дифференцируются во все типы клеток, включая половые [6]. Такая способность клеток обозначается термином «тотипотентность». Количество необластов в теле планарий составляет 20 – 30 % от общего количества клеток [7].

Было показано, что стволовые клетки планарий чрезвычайно чувствительны к ионизирующей радиации, которая приводит к гибели необластов, невозможности регенерации и прекращению гомеостатического тканевого оборота [8]. Потеря необластов сопровождается проявлением у животных характерного брюшного завивания и гибелью [9]. Только инъекция клеточной суспензии обогащенной стволовыми клетками восстанавливает у облученных планарий жизнеспособность и возможность регенерации, что подтверждает роль необластов в качестве источника клеточного материала в процессах регенерации [10].

Особенности биологии планарий сделали их классической биологической моделью для исследований в области регуляции процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток in vivo, восстановления дифференцированной ткани, клеточного оборота и старения [8]. Но до настоящего времени возможность исследования радипротекторных свойств веществ на примере планарий не была исследована.

Цель работы

Исследование радиочувствительности и радиопротективных свойств фармакологических препаратов на модели пресноводных плоских червей – планарий.

Задачи исследования:

1. Определение летальных и сублетальных доз рентгеновского облучения для планарий.

2. Исследование воздействия различных доз рентгеновского облучения на регенерацию головной части планарий.

3. Изучение возможности радиопротекции рентгеновского облучения химическим препаратом на уровне регенерации головной части планарий и стабильности геномной ДНК.

Основная часть

Работа выполнена на бесполой лабораторной расе плоских червей планариях *Schmidtea mediterranea (Platyhelminthes, Triclada)* (рис. 1). Животных содержали в прудовой воде при комнатной температуре и кормили раз в неделю личинками двукрылых. Для экспериментов отбирали животных длиной около 8 мм и прекращали их кормление за 7 дней до опытов.

Обучение планарий рентгеновским излучением

Планарий облучали с помощью рентгеновской установки РУТ – 12. Для облучения животных помещали в чашки Петри в 3 мм слой воды. Планарий облучали однократно, мощность дозы 2 гр/мин. Дозы облучения составляли: 1, 5, 10, 15 и 30 гр.

Метод прижизненной компьютерной морфометрии

Регенерация планарий вызывалась ампутацией 1/5 части тела планарий, в области непосредственно за глазами. Рост бластемы оценивали методом прижизненной морфометрии [11]. Молодая формирующаяся бластема в первые дни не покрыта пигментным эпителием, что позволяет ее четко выделить на фоне основной пигментированной части тела и измерить. Планарий фотографировали на 3 – е сутки регенерации с помощью цифровой видеокамеры AxioMRC (Carl Zeiss, Германия) и бинокулярного микроскопа МБС – 10. На полученных микрофотографиях программой для анализа изображений Plana 4. 4 определяли общую площадь тела животного и площадь бластемы. В качестве количественного критерия роста использовали индекс регенерации R=s/S, где s – площадь бластемы, S – площадь всего тела регенеранта.

Статистический анализ полученных результатов производили с помощью программы SigmaPlot (США).

Радиопротекторные препараты

В качестве радиопротектора использовали вещество, известное своими защитными свойствами от лучевого поражения – N – ацетилцистеин (Sigma, США) в конечной концентрации 1мМ [12]. Забуференный с помощью гидрооксида натрия (pH=7) водный раствор данного вещества добавляли в воду с планариями за 1 час до облучения.

Метод RAPD ПЦР

Для выявления возникновения мутаций в ДНК планарий использовали метод ПЦР со случайными праймерами [13]. ДНК планарий выделяли с помощью реагента DNAzol (Thermo, США), согласно прилагаемому протоколу. Реакционная ПЦР смесь (20 мкл) содержала 10Х буфер для Taq полимеразы (Fermentas, США), 20 нг геномной ДНК, 0. 2 мкМ праймера, 2. 5 мМ $MgCl_2$, 0. 25 мМ нуклеотидтрифосфатов (Fermentas, США), 0. 2 ед Taq полимеразы (Fermentas, США). Последовательности использованных олигонуклеотидных праймеров указаны в приложении 1, праймеры были синтезированы в фирме Евроген (Москва). Параметры ПЦР реакции были следующими: 95°С – 5 мин, 40 циклов – 95 °С – 30 сек, 37 °С – 39 сек и 72 °С – 1 мин 30 сек. и за-

тем 72 °С – 5 мин. Продукты амплификации и целостность исходной ДНК – матрицы проверяли методом электрофореза в 1,5 % агарозе, окрашенной красителем для ДНК GelRed (Biotium, США). Полученные электрофореграммы фотографировали и вычисляли коэффициент геномной стабильности (КГС) по методу, описанному в работе [13]. КГС определяли по формуле:

$$КГС\ (\%)=(1 - a/n)\ 100\%,$$

где a – количество полиморфных ампликонов в каждом образце, n – общее количество ампликонов, выявляемых с помощью гель – электрофореза.

Результаты

Воздействие рентгеновского излучения в дозах 15 и 30 гр при исследовании регенерации на 3 сутки после облучения и декапитации приводило к замедлению регенерации на 43% и 76% соответственно. Уменьшение дозы до 10 и 5 гр сопровождалось уменьшением скорости роста бластемы планарий на 50% и 35% соответственно, тогда как доза 1 гр не оказывала влияния на регенерацию (рис. 2, А). На 7 день после декапитации у планарий после облучения наблюдалась фенотипические проявления последствий рентгеновского облучения. Так в контроле у животных наблюдалось полное формирование головы, тогда как после воздействия доз 30 гр и 15 гр у планарий она полностью отсутствовала, такие животные через 25 – 30 дней погибали. После 10 гр – голова была частично недоразвита (рис. 2, Б). Меньшие дозы облучения – 1 и 5 гр не влияли на процесс морфогенеза головы планарий.

На основании обнаруженных дозозависимых эффектов на уровне регенерации головы планарий нами для исследования радиопротекторных свойств N – ацетилцистеина были использованы дозы 5 и 10 гр. Облучение животных на фоне 1 мМ препарата дозой 5 гр недостоверно снижало эффект ингибирования регенерации на 6%, а при дозе 10 гр N – ацетилцистеин значимо снижал эффект замедления роста бластемы на 25% ($p<0,001$) (рис. 3, А).

При анализе амплифицированных фрагментов геномной ДНК методом RAPD ПЦР после облучения наблюдали изменения в количестве ампликонов и характере их распределения по молекулярной массе, что указывает на возникновение мутаций в геноме (Приложение 1, рис. 1). Добавление радиопротектора увеличивало коэффициент геномной стабильности (КГС) в ДНК планарий. При облучении в дозе 5 гр КГС составлял 83%, а в присутствии радиопротектора 95%. Увеличение дозы до 10 гр снижало КГС до 71%, тогда как радиопротектор увеличивал этот параметр до 87% (рис. 3, Б).

Заключение

В результате исследования нами были обнаружены дозы рентгеновского облучения, которые способны вызывать значительное замедление процесса регенерации головы планарий, либо полную утрату способности к регенерации и последующей гибели животного. Эти эффекты обусловлены частичной или тотальной гибелью стволовых клеток планарий – необластов. В случае высоких доз облучения (15 – 30 гр) происходит гибель всех необластов, что приводит к утрате животным способности к регенерации. При дозах облучения 5 – 10 гр происходит лишь частичная гибель стволовых клеток – в итоге на 3 сутки наблюдается замедление, численность которых быстро восстанавливается, что и обуславливает в конечном счете нормальное восстановление головы на 7 сутки регенерации.

Добавление радиопротектора – N – ацетилцистеина предотвращает повреждение стволовых клеток планарий, что в итоге сопровождается снижением уровня подавления скорости регенерации головы планарий. Аналогичный эффект радиопротектора проявляется и на уровне повреждений рентгеновским излучением геномной ДНК плоских червей – добавление радиопротектора защищает геном от мутаций, возникающих вследствие облучения. Таким образом, нами впервые продемонстрирована возможность радиопротекции рентгеновского излучения с помощью химического препарата на уровне плоских червей планарий.

Выводы

1. Обнаружены летальные (15 – 30 гр) и сублетальные дозы (5 – 10 гр) рентгеновского облучения для планарий.

2. Показано, что N – ацетилцистеин обладает для планарий радиопротекторными свойствами и способен защищать геном и стволовые клетки при дозе облучения до 10 гр.

3. Планарии могут служить удобным модельным объектом для исследования радиочувствительности и радиопротекторных свойств веществ.