

*На правах рукописи*

**ДУХОВА**

**Наталья Николаевна**

**ВЛИЯНИЕ ПОСТРАДИАЦИОННЫХ ЛЕТУЧИХ ВЫДЕЛЕНИЙ МЫШЕЙ НА  
ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ИНТАКТНЫХ  
РЕЦИПИЕНТОВ**

Специальность 03.01.01 – Радиобиология (биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Обнинск – 2021

Работа выполнена в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба - филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Суринов Борис Павлович** – доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Штемберг Андрей Сергеевич** – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом космической радиобиологии и фармакологии и лабораторией радиационной и экстремальной нейрофизиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук;

**Мошкин Михаил Павлович** - доктор биологических наук, главный научный сотрудник отделения генетики животного и человека Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России.

Защита диссертации состоится «25» января 2022г. в \_\_\_\_\_ на заседании диссертационного совета Д 208.047.03 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 249036, г. Обнинск, Калужской области, ул. Королева, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (249036, г. Обнинск, Калужской области, ул. Королева, д. 4) и на сайте: <http://mrrc-obninsk.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук

Гуменецкая Юлия Васильевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования.**

Физиологическое состояние в момент облучения и последующие взаимодействия особей, как показано в рамках развиваемого направления, могут модулировать развитие пострадиационных эффектов. Это имеет значение для практики, прогнозирования и профилактики последствий облучения в профессиональных условиях (Гребенюк А.Н. и др., 2012, Иванов И.В., 2005). Так, при анализе последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции большое внимание привлекло явление радиофобии. По заключению экспертов ВОЗ (EUR / RC 45/9, 1995), именно нерадиационные факторы явились одной из основных причин нарушений здоровья у населения пострадавших районов. В частности, рассматривалось влияние коммуникаций в поставарийном периоде на здоровье людей. На основании результатов наблюдений сформулировано представление о семантическом стрессе – поставарийных эффектах у людей, непосредственно не подвергавшихся радиационному воздействию (Новиков В.С., 1995). Указанное представление имело большое значение для понимания процессов, развивающихся в посткатастрофном периоде.

В качестве одной из первых экспериментальных моделей роли коммуникаций, использованных в МРНЦ им. А.Ф. Цыба, было совместное содержание в одной клетке интактных и облученных в сублетальной дозе 4 Гр лабораторных мышей или крыс. Было установлено, что облученные или стрессированные особи способны выделять летучие вещества, которые влияют на иммунные и поведенческие реакции интактных реципиентов (Суринов Б.П. и др., 1996-2000).

Появление экспериментальных исследований влияния облученных живых объектов на жизненно важные процессы интактных привело к признанию важной роли, так называемых немишенных или коммунальных эффектов радиации (Ярмоненко С.П., 2004). В основном в них рассматриваются реализуемые с помощью метаболитов межклеточные взаимодействия культивируемых клеток тканей животных. Так, широкую известность получил «эффект свидетеля (baystander effect)» (Kanagaraj K. et al., 2004, Mothersill C. et al., 2001-2006), который был описан по снижению стабильности генома клеток животных, соседствующих с облученными. По существу, экспериментальное наблюдение переноса последствий радиационного воздействия от облученных особей на интактных с помощью летучих веществ свидетельствовало о наличии «эффекта свидетеля» не только среди клеток, но и «ин vivo» – в группах животных. Впервые межорганизменный «эффект свидетеля» в группах мышей и крыс был установлен Б. П. Суриновым с соавторами (1998 – 2001). Позднее в мировой литературе появились сведения канадских ученых об исследованиях на рыбах (Mothersill C. et al., 2001-2006).

Указанное явление переноса последствий радиационного воздействия от облученных животных к интактным находится в контексте с данными о феромонах, летучих хемосигналах, с помощью которых животные осуществляют тонкую специфическую дистанционную регуляцию многих жизненно важных физиологических реакций у особей группы и популяции (Новиков С.Н. 1998, Nepper P.G., 1990, Stoddart D.M., 1980). Исследования хемосигнализации в условиях патологических состояний немногочисленны. В связи с этим, вышеуказанный радиобиологический феномен, обусловленный, очевидно, ЛК облученных животных, нуждается во всестороннем исследовании. Оценка свойств рассматриваемых пострадиационных ЛК и закономерностей влияния на иммунную реактивность и поведение интактных животных имеет значение для выяснения биологического значения этого явления.

**Цель исследования** – изучить модификации поведенческих и иммунологических реакций интактных мышей пострадиационными летучими компонентами мочи облученных особей.

#### **Задачи исследования**

1. Оценить влияние различных факторов, в частности, тепловой обработки, условий хранения образцов на способность пострадиационных летучих компонентов мочи модифицировать поведенческие и иммунные реакции интактных мышей.

2. Установить влияние ионизирующей радиации на изменение состава летучих органических веществ мочи мышей

3. Определить зависимость эффективности пострадиационных летучих компонентов от концентрации мочи и длительности экспозиции с ними реципиентов.

4. Исследовать зависимость от дозы радиационного воздействия на мышей-доноров эффектов пострадиационных летучих компонентов на поведенческие и иммунные реакции мышей-реципиентов.

5. Изучить зависимость межорганизменных поведенческих и иммунных реакций от соотношения генотипов интактных мышей-реципиентов и мышей-доноров пострадиационных летучих компонентов.

6. Оценить значение свойств пострадиационных летучих компонентов в развитии межорганизменных реакций в группах животных.

#### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Установлены неизвестные ранее свойства пострадиационных ЛК, которые определяют основные условия дистанционного распространения последствий воздействия ионизирующей радиации в группах животных. Результаты работы расширяют современный уровень представлений о механизмах развития пострадиационных нарушений иммунитета в группах животных и демонстрируют значение в этом процессе межорганизменных коммуникаций, опосредованных летучими хемосигналами. Полученные в

работе новые факты существенно повышают достоверность гипотезы о биологической целесообразности механизмов хемосигнализации в повышении групповой жизнеспособности при радиационных воздействиях.

Результаты диссертационных исследований имеют фундаментальное значение для понимания механизмов и значения влияния пострадиационных ЛК животных на их поведенческие и иммунные реакции.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы для моделирования опосредованного развития пострадиационных реакций у млекопитающих, прогнозирования последствий воздействия радиации, испытания средств их предупреждения и коррекции.

### **Методология и методы исследования**

Зависимость свойств пострадиационных летучих выделений мышей от различных факторов, включая дозы радиации, сроки после облучения, исследовали по их влиянию на поведенческую реакцию – предпочтение-избегание интактными реципиентами и по нарушению иммунной реактивности, оцениваемой по изменению массы, клеточности лимфоидных органов и количеству АОК селезенки. Поведенческие реакции оценивали с помощью модификации Т-образного лабиринта. Иммунную реактивность – общепринятым для подобных экспериментов методом Каннингема. Образцы мочи мышей получали, используя бумажные подстилки под сетчатым дном боксов, где содержались животные, в отдельных экспериментах – методом прямого «сцеживания» мочи. В поведенческих тестах определяли частоту предпочтений сравниваемых в Т-образном лабиринте образцов мочи. Влияние на иммунную реактивность – по изменению иммунологических показателей после экспонирования мышей с образцами выделений, помещаемых под сетчатое дно боксов с животными.

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

1. После воздействия ионизирующей радиации животные продуцируют с мочой отсутствующие в норме высоко летучие компоненты, способные выполнять роль хемосигналов и определенным образом влиять на поведенческие или иммунологические реакции интактных реципиентов.

2. Поведенческие и иммунные эффекты пострадиационных компонентов на реципиентов в определенных пороговых пределах не зависят от концентрации мочи и длительности экспозиции, что позволяет относить их к хемосигналам-триггерам, обеспечивающим модификацию физиологических реакций животных в условиях воздействия ионизирующей радиации.

3. Воздействие ионизирующей радиации в диапазоне сублетальных или летальных доз индуцирует у мышей выделение летучих компонентов с привлекающими или отталкивающими интактных реципиентов свойствами соответственно.

4. Пострадиационные летучие компоненты как сингенных, так и аллогенных мышей обладают повышенной аттрактивностью для интактных

особей, но предпочтительными являются выделения сингенных мышей. Лимитирующим является генетически обусловленная иммунная и обонятельная реактивность животных.

5. Обнаруженные в работе новые свойства и эффекты пострадиационных летучих выделений животных подтверждают представление о биологической целесообразности механизмов хемосигнализации, направленных на повышение групповой жизнеспособности. Ведущее значение при этом имеет модуляция поведенческих реакций.

#### **Степень достоверности и апробация работы**

Достоверность полученных результатов подтверждена объемом проведенных исследований и воспроизведением результатов в независимых сериях экспериментов. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью современных методов статистического анализа.

Результаты работы были представлены на конференциях: Международный конгресс «Энергетика-3000» (Обнинск, 2000); Научно-практическая конференция «наследие Чернобыля» (Обнинск, Калуга, 2001); VI Съезд по радиационным исследованиям (Москва, 2000); Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии (Санкт-Петербург, 2011); XI Региональная научная конференция «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2014); Международная заочная научно-практическая конференция "Наука и образование в современном обществе: вектор развития" (РИНЦ) (Москва, 2014); VII съезд по радиационным исследованиям (Москва, 2014); Радиация и организм (Обнинск, 2015); Радиация и организм (Обнинск, 2016).

#### **Личный вклад автора**

Автор принимала непосредственное участие в планировании работы, организации и выполнении экспериментальных исследований. Проводила сбор и обработку полученных данных, в том числе статистическую, анализ и сопоставление результатов с литературными источниками.

#### **Объем и структура диссертации**

Содержание диссертации изложено на 133 страницах машинописного текста, включая 24 таблицы и 8 рисунков и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждение, выводы и список используемой литературы. Список литературы включает 207 источников, из которых 106 зарубежных.

Материалы диссертации представлены в 29 научных работах, из них 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России.

## СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Исследования выполнены на 1800 половозрелых мышах. Основная часть представленных исследований проведена на самцах линии СВА. Группы формировали за 10-12 дней до эксперимента с учетом возраста и средних значений массы тела. При изучении иммунных реакций группы состояли из 5-7 особей, а при ольфакторных поведенческих тестах - 10 особей. Облучение мышей проводили тотально  $\gamma$ -излучением ( $^{60}\text{Co}$ ) в диапазоне доз 1-10 Гр и 70 Гр на установке «Луч» (Россия) при мощности  $\gamma$ -излучения 0,4-0,6 Гр/мин.

Для сбора образцов мочи использовали два приема:

1. В опытах с ЛК мочи в клетку с животными контрольной (без воздействий) или опытной (после воздействий) группы подкладывали лист фильтровальной бумаги под сетчатое дно из нержавеющей стали. Через сутки бумажную подстилку, содержащую впитавшуюся суточную мочу, помещали в бокс с интактными реципиентами также под сетчатое дно (в случае проведения иммунологических исследований) или в «укрытие» Т-образного лабиринта (при проведении ольфакторных поведенческих тестов).

2. Для изучения физико-химических свойств ЛК, мочу мышей собирали от нескольких особей в чашку Петри в объеме 1-2 мл, провоцируя мочевыделение поглаживанием области мочевого пузыря.

**Проведение ольфакторных тестов.** Относительную аттрактивность ЛК оценивали в модификации Т-образного лабиринта (Буреш Я. и др., 1991). Центральное поле выбора освещалось галогенной лампой 100 ватт, с внешних противоположных сторон которого находились два «укрытия» (светонепроницаемые пластиковые боксы 15x10x5 см), куда могли свободно проникать мыши-тестеры (10 интактных особей). В «укрытия» помещали подстилки со сравниваемыми образцами мочи, содержащие исследуемые ЛК. Мышей-тестеров индивидуально (по шесть раз) помещали на центральное поле и оценивали частоту выбора (задержка в «укрытии» не менее чем на 30 сек).

**Проведение иммунологических исследований.** Образцы мочи, содержащие исследуемые ЛК, получали от интактных мышей или в 3-и сутки после облучения. Бумажные подстилки помещали на сутки под сетчатое дно клеток с мышами-реципиентами. По истечению суток экспонированных с ЛК реципиентов иммунизировали эритроцитами барана внутрибрюшинно в дозе  $1 \times 10^8$  клеток в 0,2 мл среды 199. Через 4 суток после иммунизации мышей декапитировали под эфирным наркозом, извлекали селезенку. Определяли общепринятыми методами массу, клеточность селезенки, а также содержание АОК в селезенке по методу Каннингема (Cunningham, 1965).

**Газомасс-хроматографические исследования.** Для изучения влияния ионизирующей радиации в дозе 4 Гр на состав выделяемых с мочой ЛК использовали газовый хроматограф «Agilent GCMSD» с интегрированной

системой термодесорбации «Gerstel TDS2» в соответствии с нормативными документами (ГОСТ Р ИСО 16000, 2008). Для обработки данных применяли модернизированную программу «GERSTEL MASTer ChemstationGC/MSD 6890/5973N HP» на базе Kayak XA6 с операционной системой Windows XP. Идентификацию соединений проводили с использованием библиотеки масс-спектров Национального института стандартов и технологий США. Проведен сравнительный анализ спектров ЛОС образцов мочи облученных и интактных-мышей самцов СВА в группах по 5 особей. Предел обнаружения идентифицированных ЛОС составляет  $5 \times 10^{-12}$  г/м<sup>3</sup>.

Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнены в соответствии с общепринятыми нормами, на основе СОП, принятых в МРНЦ им. А.Ф. Цыба, которые соответствуют правилам Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных целей (ETS-123 Strasbourg, 1986)

**Статистическая обработка результатов.** Эксперименты на животных воспроизводили не менее чем в трех независимых сериях. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0» («StatSoft Inc.», USA).

Величина (частота выбора) ольфакторного предпочтения ЛК рассчитывалась по формуле:  $P=(Y:60) \times 100\%$ , где Y – количество предпочтений определенного «укрытия» из 60 возможных (10 тестеров по 6 наблюдений). Результаты представлены в процентах относительно общего числа предпочтений данной группы-тестеров.

Оценку статистической значимости частоты встречаемости предпочтений тестерами ЛК той или иной группы определяли посредством расчета доверительных интервалов. Следует отметить, что «сдвиг» предпочтений в группах тестеров был относительно равномерным и проявлялся у абсолютного большинства из них.

Статистическую обработку результатов иммунологических исследований проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента (Жаворонков Л.П., 2012). Результаты представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Показатели выражали в абсолютных значениях, а также в процентах от контроля или группы сравнения. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Далее в тексте приведены только статистически значимые величины.

### **Результаты исследования**

#### ***Влияние нагревания, замораживания и изменения pH образцов мочи на стабильность пострадиационных летучих компонентов***

Поскольку рассматриваемые пострадиационные ЛК проявляют свою иммуносупрессивную и аттрактивную активность через воздушную среду, то было важно оценить их летучесть. В качестве основного объекта наблюдений были выбраны ЛК, продуцируемые мышами в третьи сутки после облучения в



дозе 4 Гр, так как основные результаты предшествующих исследований ЛК были получены именно при этой дозе облучения.

Для этого в течение 20 минут на водяной бане прогревали образцы мочи облученных в дозе 4 Гр мышей при температуре 35, 40 или 60°C. Температура 35°C не влияла на аттрактивные свойства ЛК – относительная аттрактивность не изменялась и не отличалась от нативных образцов. Повышение температуры до 40 и 60°C приводило к потере аттрактивности. Потеря аттрактивных свойств пострадиационных ЛК при нагревании образцов мочи не была результатом их тепловой нестабильности, а зависела от их летучести, так как нагревание образцов мочи, облученных в дозе 4 Гр мышей, до 40°C в герметически закрытой пробирке не изменяло аттрактивные свойства пострадиационных ЛК.

Влияние тепловой обработки на изменение свойств пострадиационных ЛК демонстрируется и результатами иммунологических наблюдений. Нагревание до 35°C образцов мочи почти не изменяло ее иммуносупрессивную активность, которая не отличалась от образца без нагревания. Прогревание образцов мочи мышей при 40°C приводило к потере иммуносупрессивных свойств – способность к иммунному ответу у мышей-реципиентов сохранялась на уровне интактных мышей. Замораживание при -18°C образцов мочи облученных в дозе 4 Гр мышей не влияло на иммуносупрессивную активность ЛК, она оставалась на уровне образцов, не подвергавшихся замораживанию (рисунок 1).

Представленные данные свидетельствуют о том, что пострадиационные ЛК мышей обладают высокой летучестью, т. к. утрачивают свою активность при повышении температуры выше физиологической. Их активность сохраняется при хранении образцов мочи в замороженном состоянии.

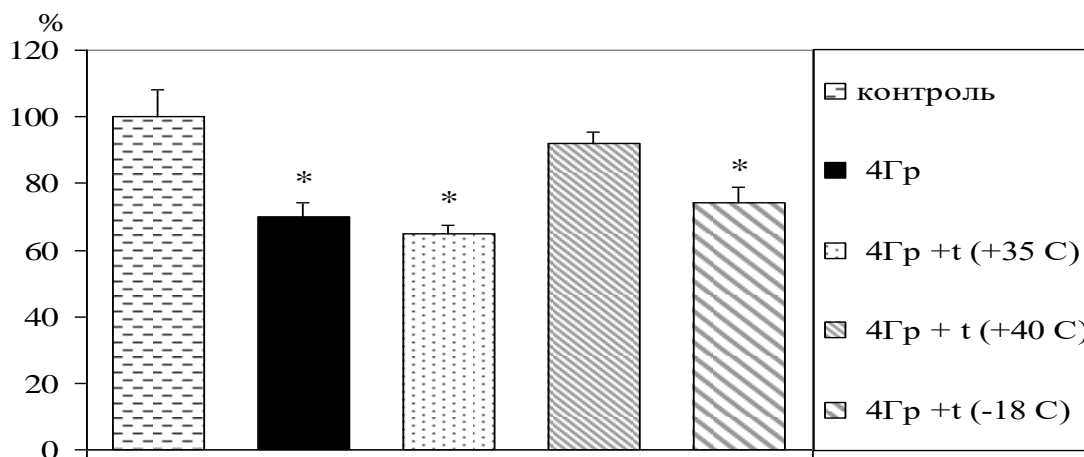


Рисунок 1 – Содержание АОК (% к контролю) в селезенке интактных мышей, экспонированных с подвергнутыми нагреванию образцами мочи облученных в дозе 4 Гр доноров.

Примечание: \* – статистически значимые отличия от контроля; в скобках – температура обработки образца мочи.

Одним из приемов изучения свойств ЛК является анализ влияния pH (Соколов В.Е. и др., 1979). Пробу мочи облученных мышей самцов линии СВА разделяли на три равных порции. Одну из них подщелачивали раствором NaOH до pH 10, другую подкисляли раствором серной кислоты до pH 1, а в третью добавляли эквивалентное количество физиологического раствора. Затем каждую из порций наносили на фильтровальную бумагу и помещали под сетчатое дно в бокс к интактным мышам на сутки.

Проба мочи с pH 10, как и проба, подкисленная до pH 1, существенно не влияла на способность к иммунному ответу интактных мышей-реципиентов. Количество АОК в селезенке реципиентов было аналогично показателям контрольных мышей. Можно предполагать, что химические компоненты, от которых зависит аттрактивные и иммуносупрессивные свойства пострadiационных ЛК, являются амфотерными веществами. Ионизация амфотерных веществ, превращение их в соли, как известно, снижает летучесть. Именно от последнего свойства и зависит дистанционный обонятельный эффект на реципиентов.

***Влияние радиационного воздействия на состав летучих органических веществ в моче мышей***

Анализ проб воздуха контейнеров с образцами мочи мышей самцов линии СВА, полученных через 1, 3, 6 и 15 суток после воздействия радиации в дозе 4 Гр, показал, что в ранние сроки наблюдается увеличение концентраций гептанона-2, гептанона-3, бутадиона-2,3, особенно 1-гидроксипропанона-2 и в меньшей степени  $\alpha$ -ненасыщенных альдегидов (деценаль, октадеценаль), гидроксиспиртов (гидроксиэтанола, гидроксипропанола). Через две недели эксперимента эти различия почти нивелировались (таблица 1).

Таблица 1 – Газомасс-хроматографический анализ образцов мочи облученных в дозе 4 Гр мышей

Летучее органическое вещество	Коэффициент повышения концентрации в разные сроки после облучения			
	1 сут	3 сут	6 сут	15 сут
Гептанон-2	2,4	1,9	1,4	1,1
Гептанон-3	2,1	1,6	1,2	1,1
Бутадион-2,3	1,7	1,3	1,2	1,0
1-гидроксипропанон-2	2,8	2,5	2,1	1,4
Деценаль	1,7	1,3	1,2	1,1
Октадеценаль	1,7	1,3	1,2	1,1
Гидроксиэтанол	1,6	1,4	1,2	1,1
Гидроксипропанол	1,6	1,4	1,2	1,1

После облучения практически не обнаруживается ацетон, количественно доминирующий в норме, но появляются фенол и его производные, фарнезены, триметиламин, олеиновая кислота, додекатриен, декагексаен, капролактамы, 2-

метоксифенол, ацетамид, фуран, 4-метилфенол, пропионовая кислота, 3-метилпентановая кислота, диметилдисульфид, метилундецен, тетраметилэтанdiamин, акрилонитрил, триазолтион - все на уровне 8 нг/л. Примечательно, что воздействие радиации на мышей сопровождается изменением содержания летучих выделений, принадлежащих к большому числу представителей разных классов химических соединений, среди которых имеются и амфотерные.

### ***Зависимость аттрактивных и иммуносупрессивных свойств пострадиационных летучих компонентов от концентрации мочи***

Оценка аттрактивных свойств пострадиационных ЛК относительно физиологического раствора показала, что разбавленные образцы мочи в пределах концентраций от 100 до 13% статистически значимо с частотой от 63,3 до 58,3% предпочитают реципиентами относительно 100%-ного физиологического раствора. При разбавлении до концентрации 3% образцы мочи облученных в дозе 4 Гр мышей полностью утрачивают привлекательность для реципиентов.

Подобное же исследование аттрактивности образцов пострадиационной (4 Гр) мочи с разными концентрациями относительно 100%-ной пострадиационной мочи (4 Гр) обнаружило статистически значимое падение частоты выбора до 43,3% при ее двукратном (концентрация 50%) или большем разбавлении.

Если сравнить аттрактивные свойства разбавленной мочи облученных (4 Гр) мышей относительно 100%-ной мочи интактных мышей, то статистически значимая предпочтительная аттрактивность (61,7%) сохраняется при концентрации пострадиационной мочи не ниже 75%. При сравнении образцов мочи облученных и интактных мышей, имеющих равные концентрации, повышенная статистически значимая привлекательность (61,7%) реципиентов к пострадиационной моче наблюдается при концентрациях сравниваемых образцов не ниже 25%. Мыши-тестеры были не способны различать образцы мочи облученных и интактных особей после их разбавления до 13 или 3%.

При сравнении разных вариантов образцов мочи облученных и интактных мышей, 100%-ных или разбавленных, установлено, что повышенная аттрактивность к пострадиационным ЛК имеет пороговый характер и проявляется вплоть до разбавления мочи до 13%. При этом различия поведенческих реакций тестеров регистрируется при изменении концентрации мочи не менее чем 1,5 раза.

Пороговую зависимость от концентрации пострадиационной мочи имеет и иммуносупрессивная активность ЛК. Содержание АОК в селезенке экспонированных с образцами мочи облученных 4 Гр мышей с концентрациями в диапазоне 100 – 10% колебалось от  $66,2 \pm 2,3$  до  $81,2 \pm 6,1\%$  к контролю. Снижение концентрации пострадиационной мочи до 3% полностью лишало ее

иммуносупрессивных, также как и аттрактивных свойств.

Зависимость аттрактивных и иммуносупрессирующих свойства пострадиационных ЛК от концентрации мочи облученных мышей имеет выраженный пороговый характер.

***Зависимость иммунологических показателей интактных мышей-реципиентов от продолжительности экспозиции с пострадиационными летучими компонентами***

Кратковременная экспозиция с пострадиационными ЛК в течение 10 и 30 мин существенно не влияет на способность мышей к антителогенезу, определяемому по содержанию в селезенке АОК. Начиная с экспозиции в 1 час и более, у интактных мышей-реципиентов развиваются нарушения способности к антителогенезу. Присутствие образца мочи облученных животных в боксе с интактными особями более продолжительное время, чем 1 час, не приводит к увеличению иммуносупрессивного эффекта. Этот факт в совокупности с данными о зависимости аттрактивных и иммуносупрессивных свойств пострадиационных ЛК от концентрации мочи облученных (4 Гр) мышей подтверждает представление о том, что исследуемые ЛК выполняют роль физиологических хемосигналов.

***Зависимость аттрактивных и иммуносупрессивных свойств летучих компонентов облученных мышей от дозы ионизирующей радиации***

В процессе исследования сравнивали образцы мочи мышей, облученных в диапазоне доз от 1 до 70 Гр, относительно мочи интактных особей (контроль).

В диапазоне доз радиации от 1 до 6 Гр мыши на протяжении первой недели наблюдения продуцируют с мочой ЛК с аттрактивными свойствами. Величина частоты предпочтений колеблется в пределах 53,3 – 63,3% и не зависит от дозы радиации и срока наблюдения. Во вторую неделю ЛК мочи облученных мышей не отличались от интактных. Увеличение дозы облучения до 10 Гр сопровождается повышением аттрактивности ЛК мочи (частота предпочтений 58,3%) относительно интактного контроля во 2-е сутки и появлением в 7-е сутки ЛК с аверсивными, отталкивающими интактных мышей-тестеров свойствами (частота предпочтений снижена до 41,7%). В 1-е и 2-е сутки мыши-тестеры не различают образцы мочи интактных и облученных 70 Гр мышей. В 3-и сутки наблюдается выраженная аверсивность ЛК облученных в дозе 70 Гр особей (частота предпочтения ЛК мочи облученных в дозе 70 Гр мышей снижалась до 38,3%). К 4-м суткам все облученные в этой дозе мыши погибали.

Представление о том, что в моче облученных мышей появляются ЛК с разными свойствами, подтверждается и данными иммунологических экспериментов. Экспонирование интактных мышей с образцами мочи облученных в дозах 1 или 2 Гр практически не влияло на их иммунную реактивность. Воздействие образцов мочи мышей, облученных в дозах 4 и 6 Гр, статистически значимо снижало содержание в селезенке АОК соответственно

до  $84,4 \pm 2,3$  и  $81,9 \pm 6,4\%$  относительно контроля. Повышение дозы до 8 Гр индуцирует появление в моче ЛК с более высокой иммуносупрессивной активностью, которые снижают содержание АОК в селезенке экспонированных с ними особей до  $56,8 \pm 2,9\%$  к контролю. Эта величина статистически значимо меньше не только по отношению к контролю, но и к величине содержания АОК в селезенке мышей, экспонированных с пострadiационными ЛК мочи мышей, облученных в дозе 6 Гр. Сказанное позволяет предполагать, что иммуносупрессивная активность сочетается с аверсивными свойствами ЛК.

***Аттрактивность интактных мышей к пострadiационным летучим компонентам мочи сингенных и аллогенных особей***

Установлено, что интактные мыши самцы линий СВА и В6 статистически значимо (по крайней мере на протяжении недели) в Т-образном лабиринте предпочитают «укрытия» с ЛК облученных в дозе 4 Гр самцов, как аллогенных, так и сингенных, относительно ЛК интактных самцов этих же линий. При этом самцы-тестеры при выборе «укрытия» с ЛК облученных мышей СВА или В6 закономерно предпочитали ЛК сингенных особей.

Для сравнительной оценки иммунных реакций двух существенно различающихся по иммунной реактивности линий мышей СВА и В6 были использованы ЛК, продуцируемые в третьи сутки пострadiационного периода. Проведенные исследования показали, что у интактных мышей СВА, экспонированных в течение суток с ЛК облученных в дозе 4 Гр сингенных животных, содержание АОК в селезенке снижалось до  $62,0 \pm 5,6\%$  по сравнению с контролем. После экспонирования мышей СВА с ЛК интактных мышей В6 уровень АОК в селезенке практически не снижался ( $88,0 \pm 5,6\%$ ). Снижение достигало существенных значений после экспонирования с ЛК облученных в дозе 4 Гр мышей В6 ( $69,2 \pm 1,6\%$ ), т.е. до такого же уровня, как и после экспонирования мышей СВА с ЛК облученных сингенных особей.

У мышей В6, линии с низкой иммунной и ольфакторной реактивностью, после экспонирования с ЛК облученных сингенных животных содержание АОК в селезенке снижалось до  $73,0 \pm 9,5\%$ . Экспонирование мышей В6 с ЛК интактных аллогенных мышей СВА приводило к более значительному снижению способности к антителогенезу ( $51,0 \pm 1,3\%$ ). Облучение не вызывало существенного усиления иммунодепрессивной активности ЛК мышей СВА по отношению к мышам В6 – антителогенез в селезенке мышей В6 в этом случае находится на уровне  $43,1 \pm 7,8\%$  относительно контроля.

Очевидно, что основные свойства пострadiационных ЛК не имеют принципиальных отличий у мышей с разным генотипом, но выраженность реакций реципиентов более значительна у сингенных особей. Также имеет значение естественная ольфакторная реактивность, как например у мышей СВА.

Несомненно, что выраженная сингенная аттрактивность интактных мышей к облученным будет определять и избирательность иммуностимулирующего эффекта естественных летучих выделений на близко родственных особей.

***Иммунотормозящие свойства летучих компонентов мочи облученных и интактных мышей***

Большинство установленных в работе свойств пострадиационных ЛК обеспечивает выполнение ими регуляторной, сигнальной функции, реализуемой при обязательном взаимодействии доноров и реципиентов. Ведущую роль при этом играют поведенческие реакции животных, которые под влиянием аттрактивных хемосигналов (в пределах сублетальных доз радиации) повышают коммуникации между интактными и облученными особями и как будет показано ниже, стимулируют иммунную реактивность последних.

Таблица 2 – Влияние летучих компонентов интактных мышей на иммунологические показатели ( $M \pm m$ , % к контролю) селезенки облученных в дозе 1 Гр мышей

Группа животных	Содержание клеток в селезенке, $1 \times 10^6$	Содержание АОК в селезенке, $1 \times 10^3$
Контроль	160,0 $\pm$ 6,2 (100,0 $\pm$ 3,9)	178,0 $\pm$ 4,2 (100,0 $\pm$ 2,4)
1 Гр	115,4 $\pm$ 12,2 (72,1 $\pm$ 7,6)*	91,7 $\pm$ 6,1 (51,5 $\pm$ 3,4)*
ЛК 1 Гр	158,8 $\pm$ 6,7 (99,3 $\pm$ 4,2)	181,6 $\pm$ 11,9 (102,0 $\pm$ 6,7)**
1 Гр + ЛК инт.	184,0 $\pm$ 26,1 (115,0 $\pm$ 16,3)**	174,6 $\pm$ 21,4 (98,1 $\pm$ 12,0)**
ЛК 1 Гр + ЛК инт.	166,4 $\pm$ 20,5 (104,0 $\pm$ 12,8)**	290,1 $\pm$ 15,1 (163,0 $\pm$ 8,5)*.***.***
Примечание: контроль – интактные мыши; 1 Гр – облученные мыши; ЛК 1 Гр – интактные мыши, экспонированные с ЛК облученных в дозе 1 Гр мышей; ЛК интактных мышей; * – статистически значимые отличия от группы контроль; ** – статистически значимые отличия от группы 1 Гр; *** – статистически значимые отличия от группы ЛК 1 Гр.		

Воздействие ионизирующей радиации в дозе 1 Гр на мышей через трое суток статистически значимо снижало относительно контроля клеточность и количество АОК в селезенке до 72,1  $\pm$  7,6% и 51,5  $\pm$  3,4% соответственно. Однако не обнаружено существенных отличий от контроля иммунологических показателей группы мышей-свидетелей (ЛК 1 Гр), экспонированных в течение

суток с образцами мочи третьих суток после облучения в дозе 1 Гр другой группы мышей (таблица 2).

К третьим суткам после облучения мышей в дозе 4 Гр (таблица 3), развивалась более глубокая иммуносупрессия, чем после облучения в дозе 1 Гр. Клеточность и содержание АОК в селезенке снижались до  $42,2 \pm 3,6\%$  и  $20,4 \pm 2,2\%$ , соответственно. У мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр), которые были экспонированы в течение суток с содержащими пострадиационные ЛК образцами мочи третьих суток после облучения в дозе 4 Гр других особей, обнаружено статистически значимое понижение содержания АОК до  $72,6 \pm 2,8\%$  относительно контроля. При этом клеточность селезенки не изменялась.

Таблица 3 – Влияние летучих компонентов интактных мышей на иммунологические показатели ( $M \pm m$ , % к контролю) селезенки облученных в дозе 4 Гр мышей

Группа животных	Содержание клеток в селезенке, $1 \times 10^6$	Содержание АОК в селезенке, $1 \times 10^3$
Контроль	$128,0 \pm 5,0$ ( $100,0 \pm 3,9$ )	$146,0 \pm 5,3$ ( $100,0 \pm 3,9$ )
4 Гр	$54,0 \pm 4,6$ ( $42,2 \pm 3,6$ )*	$29,8 \pm 3,2$ ( $20,4 \pm 2,2$ )*
ЛК 4 Гр	$135,2 \pm 8,1$ ( $105,6 \pm 6,3$ )**	$106,0 \pm 4,1$ ( $72,6 \pm 2,8$ )*, **
4 Гр + ЛК инт.	$58,0 \pm 7,6$ ( $45,3 \pm 5,9$ )*	$33,4 \pm 3,4$ ( $22,9 \pm 2,3$ )*
ЛК 4 Гр + ЛК инт	$122,8 \pm 5,6$ ( $95,9 \pm 4,4$ )**	$221,9 \pm 7,7$ ( $152,0 \pm 5,3$ )*, **, ***
Примечание: контроль – интактные мыши; 4 Гр – облученные мыши в дозе 4 Гр; ЛК 4 Гр – интактные мыши, экспонированные с ЛК облученных в дозе 4 Гр мышей; ЛК инт. – ЛК интактных мышей. * – статистически значимые отличия от группы контроль; ** – статистически значимые отличия от группы облученных в дозе 4 Гр мышей; *** – статистически значимые отличия от группы ЛК 4 Гр.		

Наблюдаемые нарушения иммунной реактивности у мышей после воздействия радиации в дозах 1 Гр и 4 Гр воспроизводят известную закономерность - с повышением дозы радиации увеличиваются и иммунные нарушения в виде снижения клеточности и количества АОК в селезенке. Возрастает и иммуносупрессирующая активность выделяемых этими животными пострадиационных ЛК. Так, у мышей-свидетелей (ЛК 1 Гр), которые представляют собой интактных особей после экспонирования с ЛК облученных в дозе 1 Гр мышей, нарушения иммунной реактивности не

наблюдаются. Они обнаруживаются только у мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр), которых получали экспонированием с ЛК мышей, облученных в дозе 4 Гр. Следовательно, иммуносупрессивная активность летучих веществ, выделяемых в разгар пострadiационных нарушений ниже, чем непосредственный иммуносупрессивный эффект радиации. После воздействия радиации снижается не только количество АОК в селезенке, но и её клеточность, тогда как у мышей-свидетелей даже после экспонирования с ЛК облученных в дозе 4 Гр мышей, понижается только количество АОК.

Несомненно, что структура и механизмы развития нарушений у totally облученных мышей и у мышей-свидетелей, опосредованных пострadiационными ЛК, различаются. Воздействие ионизирующей радиации, как известно, сопровождается повреждением лимфоидных клеток, тогда как влияние пострadiационных ЛК на мышей реализуется с участием системы обоняния, за счет физиологической регуляции функционального показателя – способности к иммунному ответу на тимусзависимый антиген (эритроциты барана).

Предположение о качественном различии между нарушениями у облученных мышей и у мышей-свидетелей более отчетливо подтверждается при сравнительной оценке влияния естественных ЛК на облученных в дозах 1 Гр или 4 Гр мышей и на мышей-свидетелей. Так, после обонятельного влияния ЛК интактных особей в течение третьих суток после облучения мышей в дозе 1 Гр восстанавливается практически до уровня контроля клеточность и количество АОК в селезенке (таблица 2). Воздействие естественных ЛК на мышей-свидетелей (ЛК 1 Гр) увеличивает количество АОК в селезенке значительно выше (до  $163,0 \pm 8,5\%$ ) интактного контроля. При этом клеточность селезенки практически не изменяется.

Экспонирование мышей в третьи сутки после облучения в дозе 4 Гр с естественными ЛК интактных особей не влияло на показатели иммунной реактивности (таблица 3), вероятно вследствие недостатка необходимых резервов иммунокомпетентных клеток. В отличие от этого, у соответствующих облученным (4 Гр) особям мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр) эти же ЛК вызывали выраженную стимуляцию иммунной реактивности - количество АОК в селезенке ЛК превышало уровень контроля (до  $152,0 \pm 5,3\%$ ). Показатель клеточности органа не отличался от контроля или от мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр) без экспонирования с ЛК.

Примечательно, что влияние естественных ЛК на мышей-свидетелей сопровождается повышением иммунной реактивности выше интактного контроля, независимо от того, с помощью каких ЛК был получен статус мышей-свидетелей (ЛК 1 Гр или ЛК 4 Гр), при том, что способность к иммунному ответу у этих мышей-свидетелей изначально существенно различалась. У мышей-свидетелей (ЛК 1 Гр) она соответствовала уровню контроля, а у мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр) была снижена на 30 %, но при этом



естественные ЛК примерно в равной степени повышали (в 1,6 и в 1,5 раза соответственно) иммунную реактивность той и другой групп мышей-свидетелей (таблица 2 и 3). Вероятно, что у мышей-свидетелей, которые получены экспонированием с пострадиационными ЛК, имеют место неспецифические адаптационные реакции, тогда как у облученных особей, особенно после воздействия радиации в дозе 4 Гр, иммунная реактивность понижена в результате непосредственного повреждения иммунокомпетентных клеток.

Наряду с влиянием исследуемых ЛК на иммунную реактивность мышей рассматриваемых здесь подопытных групп были оценены и аттрактивные их свойства, т.е. способность ольфакторно привлекать или отталкивать других особей.

Подтверждаются ранее полученные данные, что облученные мыши на протяжении 7 суток после радиационного воздействия в дозе 4 Гр выделяют с мочой ЛК с повышенной относительно контроля привлекательностью для интактных особей. В настоящем исследовании показано, что мышьи-свидетели (ЛК 4 Гр) также продуцируют привлекающие ЛК только в 5-е, 10-е и 12-е сутки наблюдения. При непосредственном сравнении аттрактивности ЛК мочи облученных в дозе 4 Гр мышей и мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр) было установлено, что интактные мыши-тестеры статистически значимо предпочитают в 3-5-е и 10-е сутки исключительно образцы мочи облученных в дозе 4 Гр особей. Следовательно, после тотального воздействия на мышей ионизирующей радиации в дозе 4 Гр выделяемые с мочой ЛК обладают более высокой привлекательностью, чем ЛК мышей-свидетелей (ЛК 4 Гр), опосредованных воздействием пострадиационных ЛК.

Из анализа полученных данных следует, что облученные в диапазоне сублетальных доз ионизирующей радиации мыши и мышьи-свидетели существенно различаются и не только тем, что у последних менее выражены нарушения иммунной реактивности и ниже аттрактивность выделяемых с мочой ЛК. Наиболее значимое отличие состоит в очень высокой чувствительности к стимулирующему эффекту естественных ЛК на мышьи-свидетелей, которая не зависит от величины исходного снижения их иммунной реактивности.

Таким образом, обусловленная пострадиационными ЛК и естественными ЛК коммуникация в группах обеспечивает возможность воздействия естественных летучих хемосигналов интактных особей на облученных или на мышьи-свидетелей. При этом повышается/восстанавливается иммунная реактивность, сниженная облучением. Примечательно, что мышьи-свидетели приобретают особую чувствительность к иммуностимулирующему эффекту естественных хемосигналов интактных особей. Можно предполагать, что особи-свидетели являются не носителями нарушений иммунитета, а способствуют восстановлению группового иммунитета.

## ВЫВОДЫ

1. Воздействие ионизирующей радиации на лабораторных мышей индуцирует выделение с мочой отсутствующих в норме высоко летучих компонентов, способных модифицировать поведенческие и иммунологические реакции реципиентов. Эти компоненты при температуре выше физиологической утрачивают аттрактивные и иммуносупрессивные свойства.

2. Высокая летучесть пострадиационных компонентов подтверждается результатами газомасс-хроматографического анализа - в ранние сроки после облучения наблюдается повышение содержания в моче ряда низкомолекулярных летучих веществ.

3. Влияние пострадиационных летучих компонентов мочи на интактных реципиентов реализуется через пусковые – триггерные механизмы, для которых необходим минимальный пороговый уровень их концентрации и продолжительность экспонирования не менее одного часа.

4. Выраженность и даже направленность эффектов пострадиационных летучих компонентов зависят от дозы радиации. После облучения в сублетальных дозах от 1 до 4 Гр доминируют аттрактивные свойства. Воздействия радиации в летальных и сверхлетальных дозах (8, 10 и 70 Гр), сопровождается выделением компонентов с аверсивными свойствами.

5. В исследованиях, проведенных на высокоинбридных мышах, установлено, что аттрактивные эффекты пострадиационных летучих компонентов наиболее выражены в отношении сингенных особей. Иммуносупрессивные эффекты на сингенных и аллогенных реципиентов не имеют принципиальных отличий, однако, степень выраженности зависит от соотношения ольфакторной реактивности особей-продуцентов и особей-реципиентов.

6. Результаты исследования подтверждают наличие биологически целесообразных механизмов межорганизменной хемосигнализации, направленных на повышение групповой жизнеспособности животных после воздействия ионизирующей радиации.

### Основные публикации по теме диссертации

1. Суринов, Б.П. Пострадиационные летучие выделения мышей: сингенные и аллогенные иммунные и поведенческие эффекты / Б.П. Суринов, В.Г. Исаева, **Н.Н. Духова** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – №10. – С.432-434.
2. Исаева, В.Г. Сингенные и аллогенные иммуносупрессивные эффекты пострадиационных летучих выделений мышей / В.Г. Исаева, **Н.Н. Духова**, Б.П. Суринов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т.44.– №4. – С.383-386.
3. Суринов, Б.П. Коммуникативное умножение вторичных нарушений показателей крови и иммунитета в группах интактных мышей, опосредованное летучими выделениями облученных особей / Б.П. Суринов, В.Г. Исаева, **Н.Н. Духова** // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. – Т.44.– №4. –С.387-391.
4. Суринов, Б.П. Аттрактивные для интактных особей пострадиационные летучие выделения мышей / Б.П. Суринов, **Н.Н. Духова** // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2004. - Т. 44 – № 6. – С. 662-665.
5. Суринов, Б.П. Свойства летучих соединений, выделяемых облученными ионизирующей радиацией животными и дистанционных «эффект свидетеля (bystander effect)»/ Б.П. Суринов, **Н.Н. Духова**, В.Г. Исаева // Радиация и риск. – 2015. –Т. 24. –№3. –С.105-112.
6. Шарецкий, А.Н. Иммуномодулирующие и аттрактивные свойства летучих компонентов облученных мышей и мышей-свидетелей / А.Н. Шарецкий, Б.П. Суринов, Н.Н. Духова, М.Р. Абрамова, Л.П. Жовтун //Радиация и риск. – 2020. – Т.29 – № 3. – С.118-128.
7. Суринов, Б.П. Изменение иммуномодулирующих и аттрактивных свойств летучих выделений мышей после радиационного воздействия или индукции “эффекта свидетеля” / Б.П. Суринов, В. Г. Исаева, **Н.Н. Духова**, А.Н. Шарецкий // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2021. – Т. 61. – № 1. – С. 5-13.

## Список сокращений

- ЛК – летучие компоненты
- АОК – антителообразующие клетки
- ЛОС – летучие органические соединения
- В6 – мыши линии С57В1/6
- СОП – стандартные операционные процедуры