

УДК 616-092

Оценка целостности и репаративных возможностей лимфоцитов при 21-дневной антиортостатической гипокинезии

Алчинова И.Б.¹, Пучкова А.А.², Баранов В.М.², Карганов М.Ю.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук.

123007 Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А

Антиортостатическую гипокинезию (АНОГ), используемую для изучения физиологических изменений, сходных с теми, что вызывает невесомость, можно рассматривать как состояние транзиторной дисрегуляции.

Цель: оценить влияние АНОГ на целостность и репаративные возможности генетического материала лимфоцитов периферической крови испытуемых.

Методы исследования. Исследование проводилось с участием 6 испытуемых-добровольцев мужского пола, которые в течение 21 суток находились в состоянии АНОГ. Общее количество лимфоцитов определяли на гематологическом анализаторе DYMIND DF50. Степень повреждения ДНК лимфоцитов оценивали методом электрофореза единичных клеток: в начале эксперимента – «0 сут», на 6-е и 21-е сутки в нативных лимфоцитах – «фон», в клетках после инкубации в течение 2-ух часов в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% аутологичной сыворотки – «восстановление», и после дополнительного УФ-облучения – «облучение».

Результаты. На 6-е сутки общее количество лимфоцитов не меняется, а к 21-м суткам у всех испытуемых наблюдается увеличение их числа. Оценка степени повреждения ДНК лимфоцитов показывает, что к 6-м суткам, видимо, в результате активации репаративных процессов, повышается количество клеток без повреждений. К окончанию АНОГ количество нормальных лимфоцитов возвращается к фоновым значениям, но среди клеток с повреждениями возрастает доля клеток с полностью разрушенной ДНК (клетки-кометы IV типа). Инкубация в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% аутологичной сыворотки в течение 2-ух часов показала, что способность устранять поврежденные клетки ослабевает уже на 6-е сутки и сохраняется на пониженном уровне до конца эксперимента. УФ-облучение незначительно повышает долю клеток с повреждениями в начале эксперимента, в основном за счет увеличения вклада комет I типа. На 6-е сутки различия доли поврежденных клеток в группе «фон» и группе «облучение» достигает статистической значимости. Однако к концу АНОГ соотношения различных типов комет в группах «фон» и «облучение» уже не различаются.

Заключение. Условия моделированной микрогравитации методом АНОГ в первую неделю эксперимента вызывают активацию адаптивных механизмов. Однако к окончанию эксперимента начинают усиливаться механизмы устранения поврежденных клеток.

Ключевые слова. антиортостатическая гипокинезия; лимфоциты; повреждения ДНК; кометный тест.

Для цитирования: Алчинова И.Б., Пучкова А.А., Баранов В.М., Карганов М.Ю. Оценка целостности и репаративных возможностей лимфоцитов при 21-дневной антиортостатической гипокинезии. *Патогенез.* 2022; 20(2): 11-18.

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.02.11-18

Для корреспонденции: Алчинова Ирина Борисовна, e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№ FGФU-2022-0010) и темы «Изучение механизмов функционирования сенсорных и двигательной систем в условиях измененной гравитационной среды и формирование концепции профилактики гипогравитационных нарушений в сверхдлительных космических полетах» (№ 63.1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 09.06.2022

Assessment of the integrity and reparative capabilities of lymphocytes during 21-day head-down bed rest

Alchinova I.B.¹, Puchkova A.A.², Baranov V.M.², Karganov M.Yu.¹

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe Shosse 76A, Moscow 123007, Russian Federation

The head-down bed rest (HDBR) used in studies of physiological changes similar to those caused by weightlessness can be considered as a condition on transient dysregulation.

Aim: To evaluate the effect of HDBR on the integrity and reparative capabilities of the genetic material of peripheral blood lymphocytes from volunteers.

Methods. The study included 6 male volunteers exposed to HDBR for 21 days. The total lymphocyte count was determined on a DYMIND DF50 hematological analyzer. The degree of damage to the lymphocyte DNA was assessed by electrophoresis of single

cells: at the beginning of the experiment (day 0) and on days 6 and 21 in native lymphocytes (background), in cells after a 2-h incubation in a phosphate-salt buffer supplemented with 1% autologous serum (recovery), and after additional UV irradiation (irradiation).

Results. On day 6, the total number of lymphocytes was unchanged whereas by day 21, all subjects showed an increase in the lymphocyte count. Evaluation of the degree of damage to the lymphocyte DNA showed that by the 6th day, the number of undamaged cells increased, apparently, as a result of activated reparative processes. By the end of HDBR, the number of normal lymphocytes returned to the background values. However, among the cells with damaged DNA, the percentage of cells with completely destroyed DNA (type IV comet cells) was increased. The 2-h incubation in phosphate-buffered saline supplemented with 1% autologous serum showed that the ability to eliminate damaged cells was weakened already on the 6th day and remained at a reduced level until the end of the experiment. UV irradiation slightly increased the proportion of damaged cells at the beginning of the experiment, mainly due to an increased contribution of type I comets. On the 6th day, the difference in the proportion of damaged cells in the background group and the irradiation group became significant. However, by the end of HDBR, the ratios of different types of comets in the background and the irradiation groups no longer differed.

Conclusions. The simulated microgravity modeled with HDBR caused the activation of adaptive mechanisms in the first week of the experiment. However, by the end of the experiment, the mechanisms for eliminating damaged cells begin increasing.

Key words: head-down bed rest; lymphocytes; DNA damage; comet test.

For citation: Alchinova I.B., Puchkova A.A., Baranov V.M., Karganov M.Yu. [Assessment of the integrity and reparative capabilities of lymphocytes during 21-day head-down bed rest]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2022; 20(2): 11-18 (in Russian).

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.02.11-18

For correspondence: Alchinova Irina Borisovna, e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Funding. The work was performed as a part of the state task: «Assessment of the body's adaptive responses to the action of physicochemical and environmental factors» (# FGFU-2022-0010) and «The study of mechanisms of functioning of sensory and motor systems in a modified gravitational environment and the formation of a concept for the prevention of hypogravitational disorders in ultra-long space flights» (# 63.1).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 09.06.2022

Введение

Состояние здоровья человека определяется целым рядом факторов, среди которых особое место занимает ресурс функций, обеспечивающих приспособление организма к условиям окружающей среды. Определение пределов стабильности, то есть способности системы выполнять свои функции в условиях действия переменных внешних факторов, представляет собой важнейшую задачу [1].

В условиях Земли для моделирования эффектов микрогравитации используют антиортостатическую гипокинезию (АНОГ). Вызывая перемещение жидкости к головному концу тела, АНОГ запускает целый каскад изменений, который приводит к изменению баланса кальция и фосфора в организме, потере костной и мышечной массы, возникновению нейроокулярного синдрома, развитию стойких нейроповеденческих эффектов [2]. В уникальных экспериментах с АНОГ принимают участие испытуемые, прошедшие строгий медицинский отбор. По сравнению с другой моделью микрогравитации — «сухой иммерсией» — изменения в организме происходят медленнее. Совокупность факторов АНОГ (ограничение подвижности и физической нагрузки, перераспределение жидкости, психоэмоциональные ограничения) выступает как значительная стрессовая нагрузка, которая уже в первые дни активизирует механизмы адаптации. Будут ли достаточны эти механизмы для обеспечения нормального функционирования организма, зависит от ресурса функций испытуемых, расходуемого на приспособление, и условий моделирования [3]. К окончанию 21-суточной АНОГ часть физиологических показателей выходят за границы популяционной нормы. Такое состояние можно рассматривать, как развитие транзиторной дизрегуляции. Множественные выбросы пока-

зателей носят обратимый характер. В этом случае АНОГ является прекрасной моделью для исследования соотношения саногенетических и патологических процессов на организменном уровне [4].

В условиях космоса одной из основных опасностей является повреждение ДНК, вызванное радиационной нагрузкой. Оценка влияния микрогравитации на целостность генетического материала проводится в основном в условиях наземного моделирования на клеточных культурах. И на сегодняшний день считается, что микрогравитация не вызывает повреждений, но затрудняет их репарацию. АНОГ создает в организме условия для закрепления последствий повреждающего действия психоэмоционального и физиологического стресса.

Физиологические изменения, вызываемые АНОГ, будучи стрессогенными, также могут вызывать повреждения ДНК [5]. Лимфоциты периферической крови человека являются удобным объектом для оценки соотношения возможностей клеток к репарации повреждений и сохранению функции, либо устранению дефектных клеток путем апоптоза.

Возникновение разрывов ДНК приводит к реорганизации хроматина, потере сверхспирализации и высвобождению фрагментов. Применение щелочного варианта метода ДНК-комет позволяет оценить выход одонитивных разрывов и щелочелабильных сайтов [6]. Дополнительное ультрафиолетовое (УФ) облучение позволяет выявить наличие участков с повышенной чувствительностью к разрывам, а инкубация в течение 2-ух часов при 37°C демонстрирует, насколько клетка может устранять повреждения за счет собственных ресурсов.

Целью работы было оценить влияние антиортостатической гипокинезии на целостность и репаративные

возможности генетического материала лимфоцитов периферической крови испытуемых.

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось с участием 6 испытуемых-добровольцев мужского пола. Масса тела – $78,0 \pm 8,5$ кг, длина тела – $179,7 \pm 5,3$ см, возраст – $30,7 \pm 5,4$ года. Исследования проводили на базе ФГБУН Государственного научного центра Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН. Добровольцы были ознакомлены с условиями проведения исследований и подписали информированное согласие на участие в качестве обследуемых лиц. Программа «Bedrest-2021» одобрена секцией «Экстремальная физиология и медицина» Ученого Совета ГНЦ РФ-ИМБП РАН и рекомендована к реализации (протокол №2 от 6.10.2021 г).

Испытуемые в течение 21 суток находились в состоянии АНОГ: в положении лежа с углом наклона тела – 6° относительно горизонта. Данное положение тела позволяет воспроизвести в организме человека целый ряд физиологических процессов, сходных с изменениями, возникающими в условиях невесомости.

Для наших исследований мы получали цельную кровь в трех временных точках: в день перевода испытуемых в горизонтальное состояние («0 сут»), 6-е сутки – промежуточная точка, испытуемые находились в состоянии АНОГ 6 суток («6 сут»), 21-е сутки – окончание АНОГ («21 сут»). Забор крови у испытуемых осуществляли в утренние часы, до приема пищи, из локтевой вены в гематологические пробирки Vacuette с антикоагулянтом K2EDTA. Анализ крови на анализаторе проводили в течение двух часов.

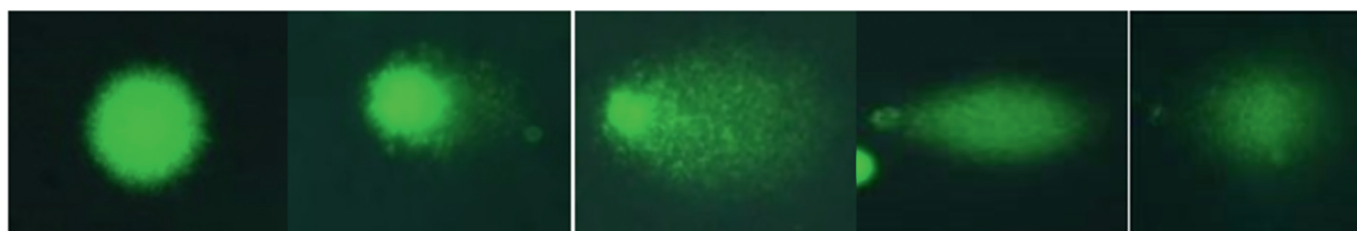
Оценку количества лимфоцитов проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIND DF50 (Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Лимфоциты выделяли из периферической крови испытуемых центрифугированием на градиенте плотности (фиколл плотностью $1,077$ г/см³, ПанЭко, Россия) [7].

Оценку степени повреждения ДНК проводили методом электрофореза единичных клеток (ДНК-кометы). Метод основан на регистрации различной подвижности в постоянном электрическом поле поврежденной ДНК

и/или фрагментов ДНК единичных лизированных клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, визуально напоминающий «хвост кометы», параметры которого зависят от степени поврежденности ДНК [8] (рис. 1).

Общая процедура метода ДНК-комет включает получение геле-слайдов (подложки), получение микропрепаратов, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию, окрашивание и микроскопический анализ. Исследуемые клетки вносили в раствор легкоплавкой агарозы на подготовленные геле-слайды. После затвердевания геля клетки подвергали лизису, приводящему к разрушению клеточных и ядерных мембран, диссоциации ДНК-белковых комплексов. Проводили щелочную денатурацию ($\text{pH} > 13$), которая переводит щелочно-лабильные сайты ДНК в однонитевые разрывы, затем проводили электрофорез. После завершения щелочного электрофореза слайды нейтрализовали, окрашивали SYBR Green и анализировали под флуоресцентным микроскопом. С двух микропрепаратов рандомизированно анализировали не менее 500 ДНК-комет без наложений хвостов. Получение изображения и обработку данных осуществляли с помощью программного-аппаратного комплекса, включающего в себя высокочувствительную камеру АРСТЕК, совмещенные с микроскопом Olympus CX31 (Япония), и специализированное программное обеспечение ImagePro (Media Cybernetics, США).

Степень повреждения ДНК оценивалась также в трёх временных точках: в начале эксперимента («0 сут»), на 6 сутки и на 21 сутки («6 сут», «21 сут»). Лимфоциты, иммобилизованные в агарозу в группе «фон», отражают степень повреждения ДНК, вызванную влиянием АНОГ. Группа «облучение» – это те же лимфоциты, подвергнутые дополнительному облучению УФ в течение 2 с. Облучение позволяет определить степень чувствительности ДНК к повреждению. УФ-облучение проводили с помощью системы Bio-Link/BLX, 254 нм, Vilber Lourmant (Южная Корея) до общей дозы 4 мДж/см². Клетки были зафиксированы в лизирующем буфере сразу после облучения. Группа «восстановление» – это «фоновые» препараты, находившиеся в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% аутологичной сыворотки в течение 2-ух часов при температуре 37°C.



Норма

Тип1

Тип2

Тип3

Тип4

Рис. 1. Варианты ДНК-комет.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета «Statistica 8» (StatSoft, USA). Для оценки динамики количества лимфоцитов использовали критерий Wilcoxon Matched Pairs Test. При оценке межгрупповых различий клеток-«комет» разного типа применяли Mann-Whitney *U* Test.

Результаты исследования

Была проведена оценка количества лимфоцитов в периферической крови испытуемых в трёх временных точках АНОГ. При оценке индивидуальной динамики можно отметить, что на 6-е сутки изменений в общем количестве лимфоцитов не происходит, а к 21-м

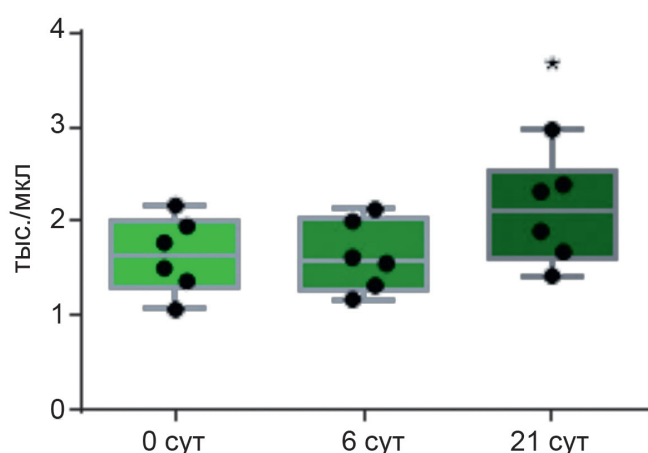


Рис. 2. Динамика содержания лимфоцитов в крови испытуемых в течение эксперимента. Данные представлены в виде медиан с квантилями (Me; [Q25; Q75]). * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением по критерию Wilcoxon Matched Pairs Test.

суткам у всех испытуемых наблюдается увеличение их числа (**рис. 2**).

Также проведен анализ соотношения клеток, содержащих ДНК разной степени повреждения, и клеток без повреждений, в трёх временных точках.

Репрезентативные фотографии ДНК-комет показывают, что облучение как таковое не вызывает немедленных повреждений ДНК. Нахождение необлученных лимфоцитов в течение 2 часов в питательной среде также не вызвало значительных повреждений (**рис. 3**).

Общей реакцией на 6-е сутки АНОГ по сравнению с точкой «0 сут» является увеличение доли нормальных клеток за счёт снижения количества комет первого типа. Кометы I типа возникают при небольшом количестве разрывов в ДНК. К 21-м суткам количество клеток без повреждений достигает первоначальных значений, но среди клеток с повреждениями увеличивается процент комет IV типа (**рис. 4**).

Активация репаративных систем к 6-м суткам, как ответ на стрессовую нагрузку, связанную с АНОГ, вероятно, устраняет незначительные повреждения. К 21-м суткам этот потенциал исчерпывается, а увеличение доли клеток-комет IV типа означает, что к концу эксперимента в крови испытуемых циркулирует $0,85 \pm 0,14\%$ клеток с поврежденным генетическим материалом.

Для оценки возможного репаративного потенциала клетки инкубировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением аутологичной сыворотки в течение двух часов (**рис. 5**). Показано, что, если в начале эксперимента («0 сут») нахождение клеток в физиологическом растворе в течение двух часов вызывало уменьшение доли клеток с повреждениями, то на 6-е сутки и на 21-е сутки разница в количестве нормальных клеток группе «фон» и группе «восстановление» отсутствует. При этом инкубация вы-

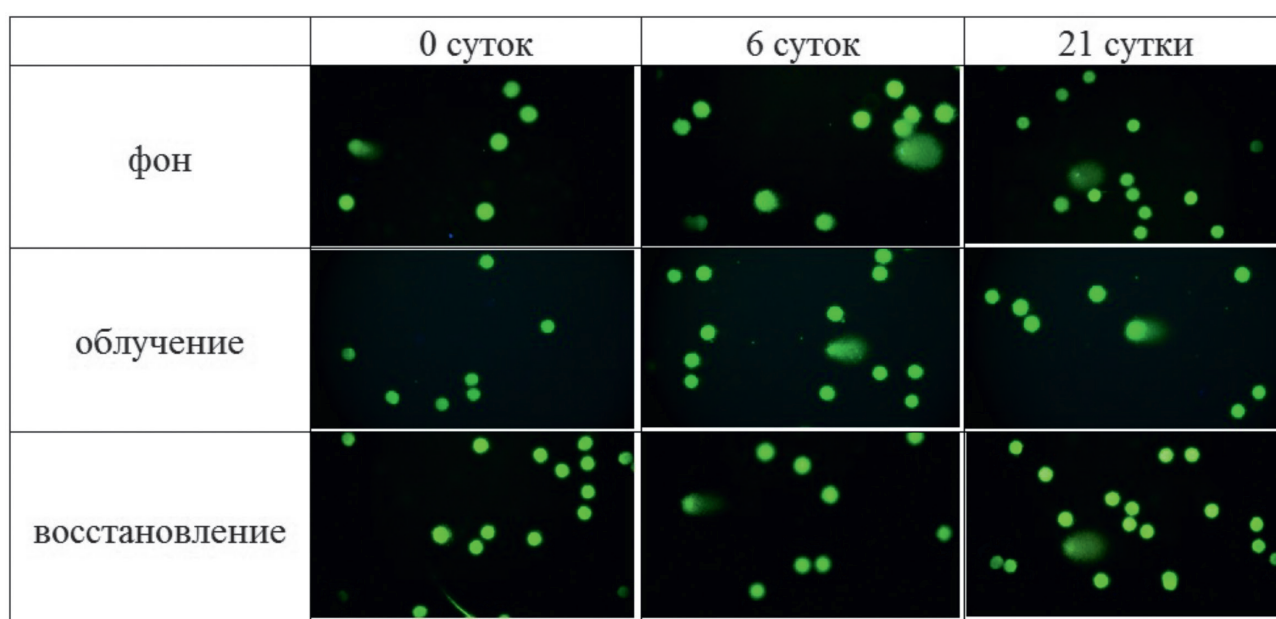


Рис. 3. Репрезентативные фотографии ДНК-комет лимфоцитов после различных воздействий в течение эксперимента (Испытуемый П-в).

зывает планомерное увеличение комет IV типа, что свидетельствует об ослаблении репаративного потенциала и усилении процессов деструкции поврежденных клеток.

Препараты с лимфоцитами были облучены УФ под тонким слоем фосфатно-солевого буфера. Выявлено, что в начале эксперимента («0 сут») УФ излучение не вызывает изменений в количестве разрывов ДНК (рис. 6). На 6-е сутки эксперимента УФ облучение вызывает появление значительного количества клеток с повреждениями. К концу АНОГ соотношение различных типов комет не отличается от исходного уровня («0 сут»).

Таким образом, хотя на 6-е сутки и происходит повышение доли неповреждённых клеток, но часть их обладает повышенной чувствительностью к действию повреждающих факторов.

Обсуждение

Известно, что в течение первых суток АНОГ развивается состояние гемоконцентрации – относитель-

ное повышение количества эритроцитов, гемоглобина, гранулоцитов и лимфоцитов, связанное с уменьшением жидкой части крови, вследствие повышения диуреза. Дальнейшая динамика показателей крови связана

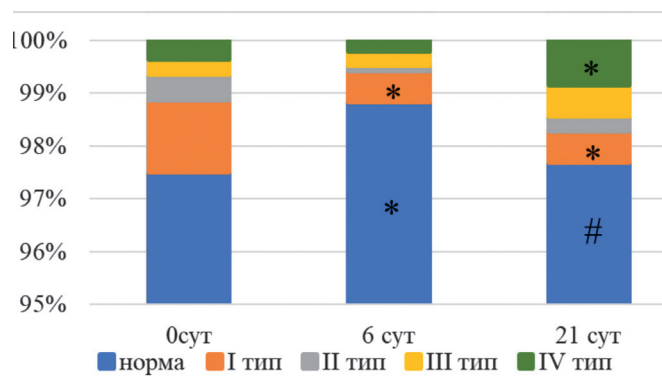


Рис. 4. Процентное соотношение клеток без повреждений и «комет» разного типа в течение АНОГ. * – по сравнению с точкой «0 сут», # – по сравнению с точкой «6 сут»; Mann-Whitney U Test, $p < 0,05$.

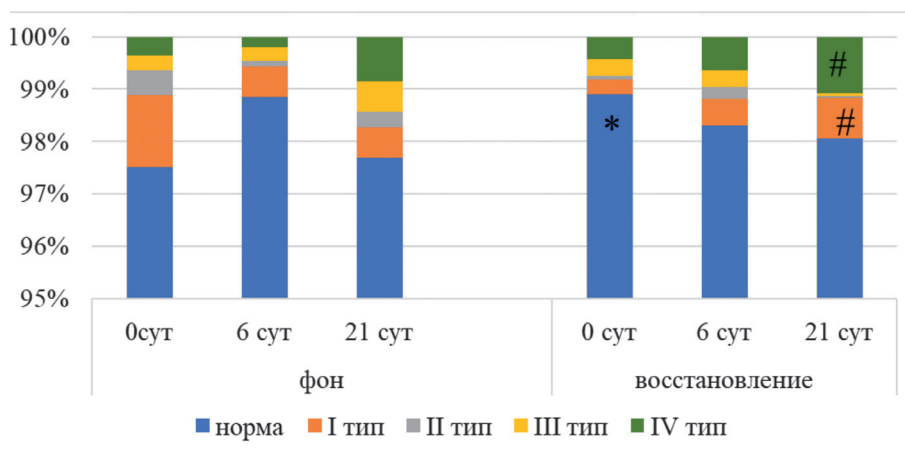


Рис. 5. Сравнение процентного соотношения клеток без повреждений и «комет» разного типа в группах «фон» и «восстановление». * – по сравнению с точкой «0 сут» в группе «фон», # – по сравнению с точкой «0 сут» в группе «восстановление»; Mann-Whitney U Test, $p < 0,05$.

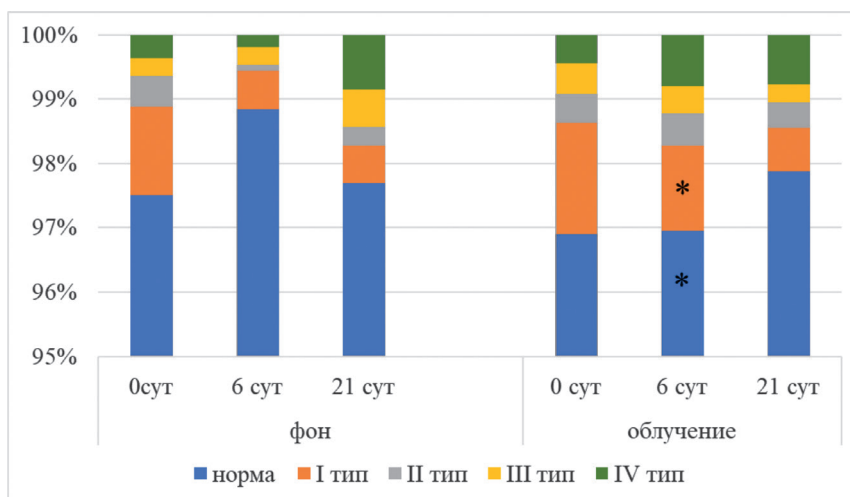


Рис. 6. Сравнение процентного соотношения клеток без повреждений и «комет» разного типа в группах «фон» и «облучение». * – по сравнению с 6-ми сутками в группе «фон»; Mann-Whitney U Test, $p < 0,05$.

с длительностью и условиями моделирования. Общее количество лимфоцитов при длительной АНОГ может оставаться без изменений, однако, изменяется их популяционный состав и функциональная активность. Так, на 15 сутки моделирования снижается количество наивных Т- (CD4, CD8) и В-клеток и увеличивается количество активированных, тканеспецифичных В-клеток памяти и Т-клеток памяти [9]. 60-дневная АНОГ не вызвала изменение общего количества лимфоцитов, но на 30-е сутки значимо повышалось количество тканеподобных В-клеток памяти (tissue-like memory B-cells) [10]. В исследовании Stowe R.P. (2008) были смоделированы условия короткой перегрузки (старт корабля) и дальнейшая микрогравитация (16 суток АНОГ). Было отмечено снижение количества нейтрофилов и увеличение количества лимфоцитов [11].

У мышей после хвостового вывешивания (аналога АНОГ) параллельно с изменением плотности бедренных костей показано снижение процента клеток общих лимфоидных предшественниц, и уменьшение молодых форм В-лимфоцитов в костном мозге, которое авторы объясняют, в том числе, и его жировой дистрофией [12]. В то же время у людей к 60 суткам АНОГ отмечается повышение в крови CD34+HSC (гематопозные стволовые клетки) [13]. АНОГ вызывает незначительные изменения в количестве лимфоцитов, при этом снижается их способность вырабатывать интерлейкины (IL-2, IFN- γ и TNF- α) при стимуляции [14]. При моделировании микрогравитации методом «сухой иммерсии» отмечены разнонаправленные изменения в секреции цитокинов, стимулирующих повышенную костную резорпцию (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, ФНО- α , GM-CSF) и ослабляющих остеокластогенез (ИФН- γ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-13) [15].

При оценке повреждающего действия кратковременного суборбитального полета на лимфоциты человека показано возрастание доли клеток с тяжелой степенью повреждения по сравнению с наземным контролем [16].

Чувствительность клеток к генотоксическим факторам зависит от стадии дифференцировки и степени функциональной активности клеток. Уменьшение в кровотоке наивных форм и увеличение высокоспециализированных является адаптивной реакцией. Оценка генотоксического действия микрогравитации в настоящее время исследуется на клеточных культурах, и определяемым параметром является экспрессия генов и активность белков. Влияние искусственной микрогравитации на повреждение ДНК и апоптоз остается спорным. Эксперименты с лимфоцитами человека, проводимые в биореакторе с вращающимися стенками (RWV), показали, что микрогравитация снижает экспрессию генов репарации. При этом репарация ошибочно спаренных нуклеотидов страдает сильнее, чем эксцизионная репарация. Также наблюдалось подавление генов, участвующих в клеточной пролиферации (CyclinD1 и PCNA) и апоптозе (Bax) [17].

В обзоре Moreno-Villanueva (2017) приводятся данные о том, что микрогравитация усиливает повреждение, вызываемые воздействием гамма-излучения [18]. Происходит ингибирование радиационно-индуцированного апоптоза, увеличение выхода хромосомных aberrаций, повышенное количество микроядер, угнетение деления. При моделировании микрогравитации в условиях Земли показывают, что отсутствие вектора гравитации меняет организацию клеточных структур, вызывает конформационные изменения молекул, тем самым снижая активность ферментов. Влияние активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов приводят к возникновению повреждений ДНК, которые в условиях микрогравитации устраняются некачественно, что приводит к немедленному или отсроченному появлению мутаций [19].

Еще одним вероятным механизмом повреждения ДНК, хорошо исследованным на мышечных клетках, является нарушение функций митохондрий, рассогласование ферментов дыхательной цепи, накоплением активных форм кислорода [20].

Таким образом совокупность факторов пребывания в АНОГ выступает как генотоксический фактор, на начальных этапах активируя саногенетические механизмы. При длительном воздействии АНОГ наблюдается истощение защитных ресурсов.

Оценка степени повреждения ДНК лимфоцитов показывает, что к 6-м суткам, видимо, в результате активации репаративных процессов, повышается количество клеток без повреждений. К окончанию АНОГ количество неповреждённых лимфоцитов возвращается к исходным значениям, но среди клеток с повреждениями возрастает процент клеток с полностью разрушенной ДНК (клетки-кометы IV типа).

Инкубация лимфоцитов в фосфатно-солевом буфере с 1% аутологичной сыворотки течение 2-ух часов при температуре 37 $^{\circ}$ C демонстрирует, что способность устранять поврежденные клетки ослабевает уже на 6-е сутки и сохраняется на пониженном уровне до конца эксперимента.

УФ-облучение незначительно повышает уровень клеток с повреждениями в начале эксперимента за счет увеличения процента комет I типа. На 6-е сутки различия доли повреждённых клеток в группе «фон» и группе «облучение» достигает статистической значимости. Возможно, что высокий уровень нормальных клеток в группе «фон», связанный с репарацией, характеризуется наличием популяции клеток с высокой чувствительностью к разрывам при дополнительной нагрузке.

При окончании АНОГ уровень неповреждённых клеток соответствует значениям до экспериментального воздействия. Однако, основная часть поврежденных клеток представлена кометами IV типа.

Возможно, что в течение АНОГ происходит смена адаптивных механизмов. На ранних этапах повреждения в клетках репарируются, частично ошибочно, повышая тем самым чувствительность клеток к поврежда-

ющим воздействиям. К окончанию эксперимента начинают преобладать механизмы устранения поврежденных клеток. Наличие клеток, содержащих сильно фрагментированную ДНК, может свидетельствовать об усилении процессов апоптоза. Повышение общего количества лимфоцитов к окончанию АНОГ может быть связано и с компенсаторным их выбросом из депо на смену клеткам с повреждениями, а, следовательно, функционально неактивным.

Выводы

1. Состояние организма, вызванное АНОГ, можно рассматривать как модель комплексного физиологического и психологического стресса, позволяющую оценивать соотношение саногенетических и патофизиологических процессов.

2. Условия моделированной микрогравитации методом АНОГ вызывают в первую неделю эксперимента снижение количества поврежденных клеток, что связано с активацией адаптивных механизмов. К 21-м суткам основная часть поврежденных клеток представлена клетками с сильно фрагментированной ДНК.

3. Преобладание саногенетических механизмов на 6-е сутки эксперимента приводит к повышению процента клеток без повреждений, которые, вероятно, выполняют свою функцию, но обладают повышенной чувствительностью к ультрафиолетовому облучению.

4. Изменение функциональной активности лимфоцитов вследствие повреждения ДНК к 21-м суткам АНОГ, возможно, является фактором, стимулирующим повышение общего количества этих клеток.

Авторский вклад

Алчинова И.Б. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, подготовка иллюстративного материала, написание текста. Пучкова А.А. — проведение эксперимента «Bedrest-2021», взятие образцов крови испытуемых. Баранов В.М. — редактирование, окончательное утверждение версии для публикации. Карганов М.Ю. — написание текста, редактирование, окончательное утверждение версии для публикации.

Список литературы

- Alchinova I, Karganov M. Physiological Balance of the Body: Theory, Algorithms, and Results. *Mathematics*. 2021; 9(3): 1–8. DOI: 10.3390/math9030209
- Brauns K., Friedl-Werner A., Gunga H.Ch., Stahn A.C. Effects of two months of bed rest and antioxidant supplementation on attentional processing. *Cortex*. 2021; 141: 81–93. DOI: 10.1016/j.cortex.2021.03.026
- Hargens A.R., Vico L. Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J. Appl. Physiol.* 2016; 120(8): 891–903. DOI: 10.1152/japplphysiol.00935.2015
- Крыжановский Г.Н. *Основы общей патофизиологии*. Москва: ООО Медицинское информационное агентство, 2011. 256 с.
- Hara M.R., Kovacs J.J., Whalen E.J., Rajagopal S., Strachan R.T., Grant W., Towers A.J., Williams B., Lam Ch.M., Xiao K., Shenoy

- S.K., Gregory S.G., Ahn S., Duckett D.R., Lefkowitz R.J. A stress response pathway regulates DNA damage through β_2 -adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*. 2011; 477: 349–353. DOI: 10.1038/nature10368
- Сорочинская У.Б., Михайленко М. В. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждения ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды. *Онкология*. 2008; 10(2): 303–09.
- Ковальчук Л. В., Игнатъева Г.А., Ганковская Л.В. *Иммунология: практикум*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 194 с.
- Olive P.L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 2006; 1: 23–29. DOI: 10.1038/nprot.2006.5
- Xu X., Tan C., Li P., Zhang S., Pang X., Liu H., Li L., Sun X., Zhang Yu, Wu H., Chen X., Ge Q. Changes of Cytokines during a Spaceflight Analog - a 45-Day Head-Down Bed Rest. *PLOS ONE*. 2013; 8(10): e77401. DOI: 10.1371/journal.pone.0077401
- Bonnefoy J., Baselet B., Moser D., Ghislin S., Miranda S., Riant E., Vermeesen R., Keiler A.M., Baatout S., Choukér A., Fripiat J-P. B-cell homeostasis is maintained during two months of head-down tilt bed rest with or without antioxidant supplementation. *Front. Immunol.* 2022; 13: 830662. DOI: 10.3389/fimmu.2022.830662
- Stowe R.P., Yetman D.L., Storm W.F., Sams C.F., Pierson D.L. Neuroendocrine and immune responses to 16-day bed rest with realistic launch and landing G profiles. *Aviat. Space Environ. Med.* 2008; 79(2): 117–122(6). DOI: 10.3357/ASEM.2205.2008
- Lescale C., Schenten V., Djeghloul D., Bennabi M., Gagnier F., Vandamme K., Strazielle C., Kuzniak I., Petite H., Dosquet C., Fripiat J.-P., Goodhardt M. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J.* 2015; 29: 455–463. DOI: 10.1096/fj.14-259770
- Hoff P.B., Belavý D.L., Huscher D., Lang A., Hahne M., Kuhlmeier A.-K., Maschmeyer P., Armbrrecht G., Fitzner R., Perschel F.H., Gaber T., Burmester G.-R., Straub R.H., Felsenberg D., Buttgerit F. Effects of 60-day bed rest with and without exercise on cellular and humoral immunological parameters. *Cel. Mol. Immunol.* 2015; 12: 483–492. DOI: 10.1038/cmi.2014.106
- Kelsen J., Bartels L.E., Dige A., Hvas Ch. L., Frings-Meuthen P., Boehme G., Thomsen M.K., Fenger-Gron M., Dahlerup J.F. 21 Days head-down bed rest induces weakening of cell-mediated immunity - some spaceflight findings confirmed in a ground-based analog. *Cytokine*. 2012; 59(2): 403–409. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.04.032
- Кутько О.В., Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Калинин С.А., Шульгина С.М., Садова А.А., Орлова К.Д., Киселёва Д.Д., Шмаров В.А., Васильева Г.Ю., Пономарёв С.А. Влияние 21-суточной «сухой» иммерсии на продукцию т-лимфоцитами цитокинов, вовлеченных в регуляцию метаболизма костной ткани. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2019; 53(6): 42–46. DOI: 10.21687/0233-528X-2019-53-6-42-46
- Alchinova I, Polyakova M., Karganov M., Baranov M., Mullin N., Kalinkin S., Morozov K., Balugin N., Yushkov V. Influence of factors of short-term suborbital flight on functional activity of human lymphocytes. *Front. Physiol. Conference Abstract*. 2018; 251–255. DOI: 10.3389/conf.fphys.2018.26.00018
- Kumari R., Singh K.P., Dumond J.W. Jr. Simulated Microgravity Decreases DNA Repair Capacity and Induces DNA Damage in Human Lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* 2009; 107(4): 723–731. DOI: 10.1002/jcb.22171
- Moreno-Villanueva M., Wong M., Lu T., Zhang Y., Wu H. Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response. *NPJ Microgravity*. 2017; 3: 14. DOI: 10.1038/s41526-017-0019-7
- Beheshti A., McDonald J.T., Hada M., Takahashi A., Mason Ch.E., Mognato M. Genomic Changes Driven by Radiation-Induced DNA Damage and Microgravity in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(19): 10507. DOI: 10.3390/ijms2219105
- Шарло К. А., Львова И. Д., Шенкман Б. С. Взаимосвязь окислительного метаболизма и эпигенетической регуляции экспрессии генов в условиях функциональной разгрузки. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2022; 58 (3): 171–187. DOI: 10.31857/S0044452922030056

References

- Alchinova I, Karganov M. Physiological Balance of the Body: Theory, Algorithms, and Results. *Mathematics*. 2021; 9(3): 1–8. DOI: 10.3390/math9030209

2. Brauns K., Friedl-Werner A., Gunga H.Ch., Stahn A.C. Effects of two months of bed rest and antioxidant supplementation on attentional processing. *Cortex*. 2021; 141: 81–93. DOI: 10.1016/j.cortex.2021.03.026
3. Hargens A.R., Vico. L. Long-duration bed rest as an analog to microgravity. *J. Appl. Physiol.* 2016; 120(8): 891–903. DOI: 10.1152/jappphysiol.00935.2015
4. Kryzhanovskii G.N. [Fundamentals of general pathophysiology]. Moscow: Medical Information Agency, 2011. 256 p. (in Russian)
5. Hara M.R., Kovacs J.J., Whalen E.J., Rajagopal S., Strachan R.T., Grant W., Towers A.J., Williams B., Lam Ch.M., Xiao K., Shenoy S.K., Gregory S.G., Ahn S., Duckett D.R., Lefkowitz R.J. A stress response pathway regulates DNA damage through β_2 -adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*. 2011; 477: 349–353. DOI: 10.1038/nature10368
6. Sorochinskaya U.B., Mihajlenko M.V. [Application of the DNA comet method to assess DNA damage caused by various environmental agents]. *Oncologiya [Oncology]*. 2008; 10(2): 303–309. (in Russian)
7. Koval'chuk L.V., Ignat'eva G.A., Gankovskaya L.V. [Immunology: practicum]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 194 p. (in Russian)
8. Olive P.L., Banáth J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 2006; 1: 23–29. DOI: 10.1038/nprot.2006.5
9. Xu X., Tan C., Li P., Zhang S., Pang X., Liu H., Li L., Sun X., Zhang Yu, Wu H., Chen X., Ge Q. Changes of Cytokines during a Spaceflight Analog - a 45-Day Head-Down Bed Rest. *PLOS ONE*. 2013; 8(10): e77401. DOI: 10.1371/journal.pone.0077401
10. Bonnefoy J., Baselet B., Moser D., Ghislin S., Miranda S., Riant E., Vermeesen R., Keiler A.M., Baatout S., Choukér A., Fripiat J-P. B-cell homeostasis is maintained during two months of head-down tilt bed rest with or without antioxidant supplementation. *Front. Immunol.* 2022; 13: 830662. DOI: 10.3389/fimmu.2022.830662
11. Stowe R.P., Yetman D.L., Storm W.F., Sams C.F., Pierson D.L. Neuroendocrine and immune responses to 16-day bed rest with realistic launch and landing G profiles. *Aviat. Space Environ. Med.* 2008; 79(2): 117–122(6). DOI: 10.3357/ASEM.2205.2008
12. Lescale C., Schenten V., Djeghloul D., Bennabi M., Gaignier F., Vandamme K., Strazielle C., Kuzniak I., Petite H., Dosquet C., Fripiat J.-P., Goodhardt M. Hind limb unloading, a model of spaceflight conditions, leads to decreased B lymphopoiesis similar to aging. *FASEB J.* 2015; 29: 455–463. DOI: 10.1096/fj.14-259770
13. Hoff P.B., Belavý D.L., Huscher D., Lang A., Hahne M., Kuhlmeier A.-K., Maschmeyer P., Ambrecht G., Fitzner R., Perschel F.H., Gaber T., Burmester G.-R., Straub R.H., Felsenberg D., Buttgerit F. Effects of 60-day bed rest with and without exercise on cellular and humoral immunological parameters. *Cel. Mol. Immunol.* 2015; 12: 483–492. DOI: 10.1038/cmi.2014.106
14. Kelsen J., Bartels L.E., Dige A., Hvas Ch. L., Frings-Meuthen P., Boehme G., Thomsen M.K., Fenger-Gron M., Dahlerup J.F. 21 Days head-down bed rest induces weakening of cell-mediated immunity - Some spaceflight findings confirmed in a ground-based analog. *Cytokine*. 2012; 59(2): 403–409. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.04.032
15. Kut'ko O.V., Rykova M.P., Antropova E.N., Kalinin S.A., SHul'gina S.M., Sadova A.A., Orlova K.D., Kiselyova D.D., SHmarov V.A., Vasil'eva G.YU., Ponomaryov S.A. [The effect of 21-day “dry” immersion on the production of cytokines by t-lymphocytes involved in the regulation of bone metabolism]. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya medicina [Aerospace and environmental medicine]*. 2019; 53(6): 42–46. DOI: 10.21687/0233-528X-2019-53-6-42-46 (in Russian)
16. Alchinova I, Polyakova M., Karganov M., Baranov M., Mullin N., Kalinkin S., Morozov K., Balugin N., Yushkov V. Influence of factors of short-term suborbital flight on functional activity of human lymphocytes. *Front. Physiol. Conference Abstract.* 2018; 251–255. DOI: 10.3389/conf.fphys.2018.26.00018
17. Kumari R., Singh K.P., Dumond J.W. Jr. Simulated Microgravity Decreases DNA Repair Capacity and Induces DNA Damage in Human Lymphocytes. *J. Cell. Biochem.* 2009; 107(4): 723–731. DOI: 10.1002/jcb.22171
18. Moreno-Villanueva M., Wong M., Lu T., Zhang Y., Wu H. Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response. *NPJ Microgravity.* 2017; 3: 14. DOI: 10.1038/s41526-017-0019-7
19. Beheshti A., McDonald J.T., Hada M., Takahashi A., Mason Ch.E., Mognato M. Genomic Changes Driven by Radiation-Induced DNA Damage and Microgravity in Human Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(19): 10507. DOI: 10.3390/ijms22191055
20. Sharlo K. A., L'vova I. D., Shenkman B. S. [The relationship of oxidative metabolism and epigenetic regulation of gene expression in conditions of functional unloading]. *Zhurnal evolyucionnoi biokhimii i fiziologii [Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology]*. 2022; 58 (3): 171–187. DOI: 10.31857/S0044452922030056 (in Russian)

Сведения об авторах:

Алчинова Ирина Борисовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Пучкова Алина Александровна — научный сотрудник лаборатории физиологических эффектов гипокинетических воздействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0002-8746-1613>

Баранов Виктор Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник, руководитель научного направления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии наук; <https://orcid.org/0000-0002-4914-8343>

Карганов Михаил Юрьевич — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>