

ИНДУКЦИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ КОРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ γ -КВАНТОВ ^{60}Co

*Т. С. Буланова^{а, б, 1}, М. Г. Заднепрянец^{а, б}, Л. Йежкова^{а, в},
Е. А. Круглякова^{а, б}, Е. В. Смирнова^{а, б}, А. В. Борейко^{а, б}*

^а Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

^б Университет «Дубна», Дубна, Россия

^в Химико-технологический университет, Прага

Методом иммуногистохимического окрашивания изучена индукция и репарация двуниевых разрывов ДНК на парафиновых срезах мозжечка крыс после воздействия γ -квантов ^{60}Co . Исследована дозовая зависимость выхода радиационно-индуцированных колокализированных $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов, установлен ее линейный характер. Также исследована кинетика формирования и элиминации радиационно-индуцированных колокализированных $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов. Показано, что через 24 ч пострадиационной инкубации происходит эффективная элиминация радиационно-индуцированных фокусов.

Induction and repair of DNA double-strand breaks were investigated using the immunohistochemical staining procedure of paraffin-embedded rat cerebellum tissues after exposure to γ rays of ^{60}Co . Dose dependence of radiation-induced colocalized $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ foci was studied and its linear character was established. Also, the kinetics of formation and repair of radiation-induced colocalized $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ foci was investigated. It was shown that effective elimination of these foci occurred 24 h after irradiation.

PACS: 87.53.-j; 87.19.La; 87.14.Gg

ВВЕДЕНИЕ

Исследования механизмов биологического действия ионизирующих излучений на структуры центральной нервной системы (ЦНС) в последние годы приобретают все большую актуальность в связи с решением широкого круга фундаментальных и практических задач. Они касаются вопросов использования различных видов ионизирующих излучений в терапии злокачественных новообразований, решения задач космической радиобиологии, обеспечения радиационной безопасности персонала атомных производств.

Данные о развитии радиационных синдромов при действии различных видов ионизирующих излучений, особенно при действии тяжелых заряженных частиц на структуры

¹E-mail: bulanova_tatyan@mail.ru

головного мозга, приводящих к нарушениям его интегративной целостности, дают основания рассматривать ЦНС как «критическую» систему при оценке риска радиационного воздействия на организм излучений, особенно при осуществлении межпланетных полетов [1]. С учетом этого необходимо изучение всей совокупности нейрорадиобиологических эффектов, индуцируемых различными видами ионизирующих излучений.

Снижение уровня нейромедиаторов в различных отделах мозга [2], нарушение межсинаптических нейрональных взаимодействий [3] и гибель нервных клеток при облучении могут свидетельствовать о тяжелых повреждениях генетических структур, контролирующих синтез важных белков, обеспечивающих интегративную функциональную целостность ЦНС. Наиболее тяжелыми повреждениями ДНК, как известно, являются двуниевые разрывы (ДР) ДНК, которые могут привести к митотической и апоптотической гибели клеток, мутации генов, контролирующих синтез белковых продуктов. С учетом этого представляются весьма важными исследования закономерностей формирования и репарации ДР ДНК в нейронах различных отделов мозговых структур при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Особый интерес представляют такого рода исследования при облучении *in vivo*. Удобной структурой для изучения закономерностей индукции и репарации ДР ДНК является мозжечок — структура, контролирующая координацию, вербальную память и ряд других жизненно важных функций [4].

Тканевая организация мозжечка обладает хорошо различимой структурой. Серое вещество образует кору мозжечка, которая имеет специфическое строение. Верхний (I) слой коры мозжечка — молекулярный слой, состоит из параллельных волокон, разветвлений дендритов и аксонов II и III слоев. В нижней части молекулярного слоя встречаются корзинчатые и звездчатые клетки, которые обеспечивают взаимодействие клеток Пуркинье, являющихся отличительной особенностью коры мозжечка. Клетки Пуркинье образуют средний (II) слой коры и выстроены в ряд. Клетки Пуркинье имеют дендритную систему, которая позволяет им выполнять задачу сбора, обработки и передачи информации. Аксоны клеток Пуркинье являются единственным путем, которым кора мозжечка передает информацию в его ядра и ядра структуры большого мозга. Под II слоем коры (под клетками Пуркинье) лежит гранулярный (III) слой, состоящий из клеток-зерен. Аксоны этих клеток поднимаются в молекулярный слой, где Т-образно разветвляются на поверхности коры, образуя дорожки контактов с клетками Пуркинье.

Особенности тканевой организации мозжечка позволяют проводить количественные оценки повреждающего действия излучений на нейроны мозжечка и, прежде всего, на клетки Пуркинье [5]. Целью нашей работы являлось изучение закономерностей формирования ДР ДНК *in vivo* в нейронах мозжечка крыс при действии γ -квантов ^{60}Co . Оценка формирования ДР ДНК в клетках Пуркинье была выполнена на основе оценки образования γH2AX и 53BP1 фокусов. Как известно, ДР ДНК, возникающие в результате воздействия ионизирующего излучения, вызывают фосфорилизацию гистона H2AX и инициируют миграцию ряда репарационных белков: MRE/NBS1/RAD50, MDC1, 53BP1, и BRCA1 к поврежденной ДНК, где эти белки колокализуются и взаимодействуют с γH2AX [6]. Количественная оценка возникающих фокусов белков репарации ДНК в геноме клеток позволяет судить о формировании ДР ДНК в нейронах различных тканей ЦНС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Облучение γ -квантами ^{60}Co самок крыс ($n = 7$) линии *Sprague Dawley* проводили в возрасте 11 недель (вес $(221 \pm 7,5)$ г). Для исключения влияния возможных эффектов тотального облучения на формирование фокусов в клетках головного мозга проводили облучение головы животного. Для этого животное помещали в пластиковый контейнер, фиксирующий положение. Тело прикрывали свинцовые пластины, оставляя открытой только голову. Контрольных животных также помещали в пластиковый фиксатор для имитации стрессовых условий облучения.

Через 1, 4 и 24 ч после облучения проводили декапитацию и извлечение головного мозга, который в дальнейшем помещали в раствор 4%-го формальдегида в фосфатном буфере (рН 7,4) на 20 ч. Затем ткань дегидратировали в этаноле (70, 80, 96, 100%), просветляли в о-ксилоле и заливали в парафин. Нарезку тонких срезов (5 мкм) проводили на ротационном микротоме Microm HM 340E (Thermo Fisher Scientific). Для изучения индукции-элиминации радиационно-индуцированных колокализованных γH2AX и 53BP1 фокусов был использован метод иммуногистохимического окрашивания парафиновых срезов мозга крыс с использованием первичных и вторичных антител. Вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой, позволяют выявить специфические белки-маркеры ДР ДНК. Маркерами являлись фосфорилированный гистон H2AX (γH2AX) и репарационный белок 53BP1. Срезы предварительно депарафинировали в о-ксилоле и регидратировали в этаноле (100, 96, 80, 70, 50%). Демаскирование антигенов проводили в цитратном буфере (Праймбиомед, рН 6.0) при 95 °С на водяной бане. Пермеабиллизацию проводили в 0,2% Triton X-100 в течение 45 мин. Для блокировки неспецифического связывания антител использовали раствор 7,5%-й козьей сыворотки и 7,5%-й эмбриональной телячьей сыворотки в фосфатном буфере. Для связывания с белками-маркерами ДР добавляли первичные антитела мышинные γH2AX (1:200) anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) (JBW301, Millipore-Upstate) и кроличьи 53BP1 (1:200)

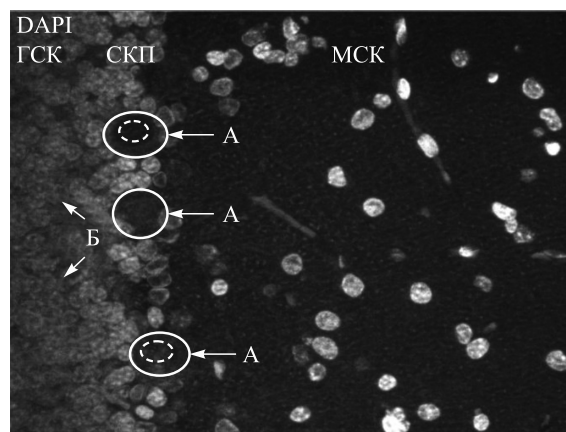


Рис. 1. Изображение коры мозжечка необлученной крысы при 1000 \times увеличении (DAPI). Стрелки А указывают на клетки Пуркинью, штриховой линией отмечено ядро; стрелки Б — гранулярные клетки. МСК — молекулярный слой клеток; СКП — слой клеток Пуркинью; ГСК — гранулярный слой клеток

anti-53BP1 antibody [EPR2172(2)] (Abcam, ab175933). Визуализацию фокусов проводили с использованием флуоресцентных красителей FITC (1:200) и Texas Red (1:400), конъюгированных с вторичными антителами от Abcam goat anti-mouse для FITC и goat anti-rabbit для Texas Red. Раствор DAPI (600нМ, Sigma) и фотозащитной среды Vectashild H-1000 (VectorLaboratories) применялся для окраски ядер. Изображения окрашенных препаратов получали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiolmager. M2 (Carl Zeiss).

При построении дозовых зависимостей выхода и кинетики индукции-элиминации ко-локализованных радиационно-индуцированных фокусов (РИФ) γ H2AX/53BP1 анализировались не менее 25 клеток. Клетки Пуркинью были дифференцированы от других клеток коры мозжечка по морфологическому критерию, как клетки, имеющие большую цитоплазму, бледную окраску ядра DAPI (рис. 1, стрелки А). Ядра гранулярных клеток были идентифицированы по интенсивной окраске DAPI (рис. 1, стрелки Б) и небольшому ядру по сравнению с ядрами клеток Пуркинью. Клетки Гольджи в гранулярном слое встречались редко и имели большее ядро по сравнению с гранулярными клетками (не показаны).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2, а представлена дозовая зависимость частоты образования радиационно-индуцированных γ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах клеток Пуркинью коры мозжечка через 1 ч после воздействия γ -квантов. Как можно видеть, зависимость имеет линейный характер и количество РИФ γ H2AX/53BP1 на клетку достигает значительных величин —

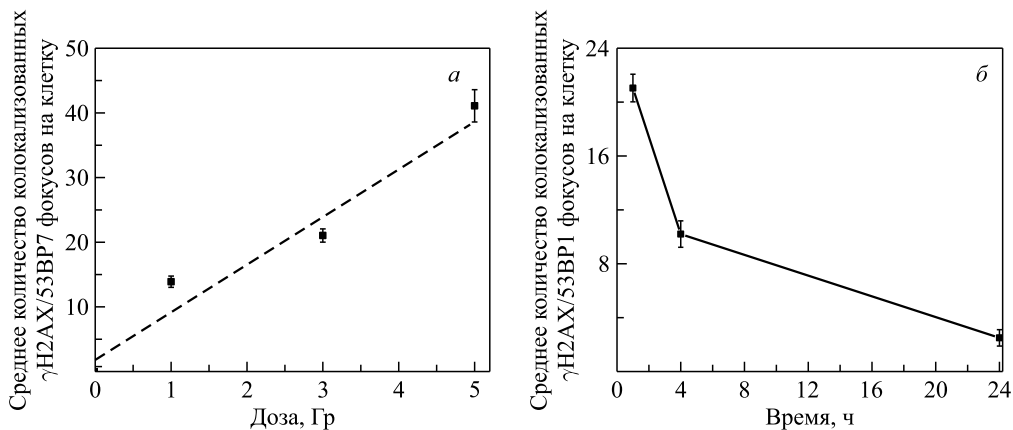


Рис. 2. а) Дозовая зависимость формирования радиационно-индуцированных колокализованных γ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах клеток Пуркинью в коре мозжечка крыс после воздействия γ -квантов ^{60}Co через 1 ч после облучения. Представлены значения среднего количества колокализованных γ H2AX/53BP1 фокусов на клетку со стандартной ошибкой, и проведена линейная аппроксимация $y = 7,37x + 1,8$ ($R^2 = 0,869$). б) Кинетика индукции и элиминации радиационно-индуцированных колокализованных γ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах клеток Пуркинью в коре мозжечка крыс после воздействия γ -квантов ^{60}Co в дозе 3 Гр через 1, 4 и 24 ч. Указано среднее число колокализованных γ H2AX/53BP1 фокусов на клетку со стандартной ошибкой

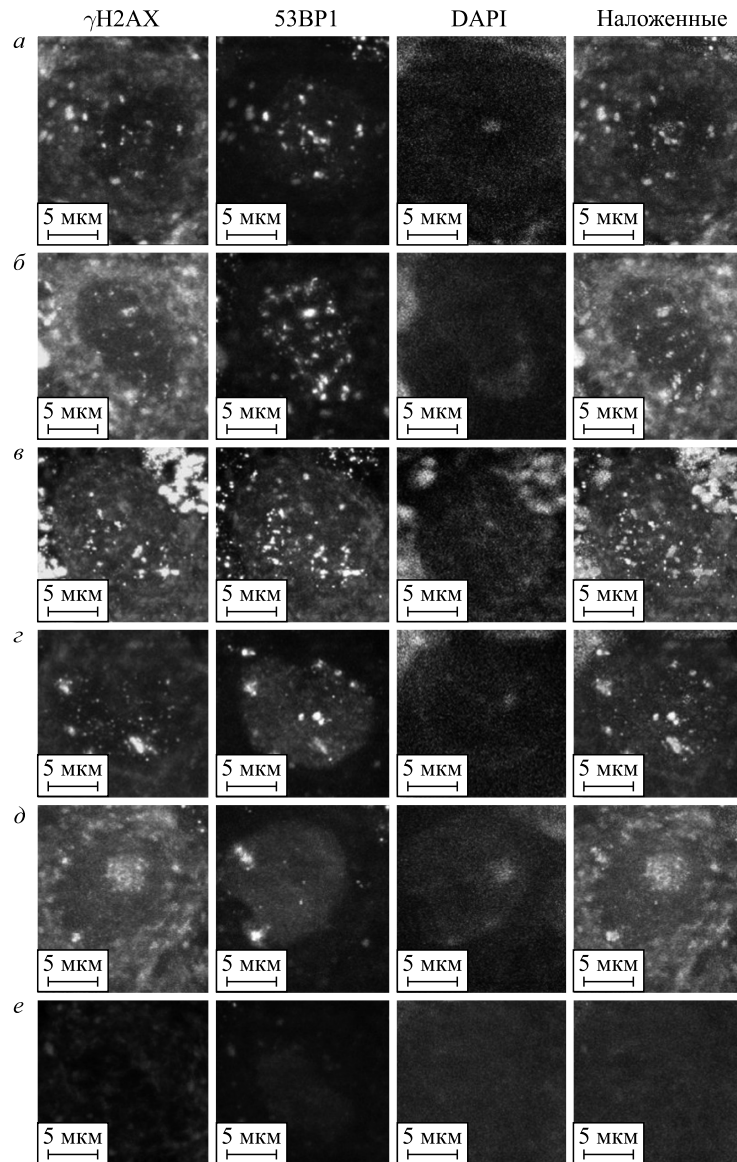


Рис. 3. Формирование γ H2AX и 53BP1 фокусов в клетках Пуркинье после воздействия γ -квантов ^{60}Co в дозе: а — 1 Гр; б — 3 Гр; в — 5 Гр через 1 ч после облучения. Формирование-элиминация γ H2AX и 53BP1 фокусов в клетках Пуркинье после воздействия γ -квантов ^{60}Co в дозе 3 Гр через: б — 1 ч; г — 4 ч; д — 24 ч; е — контроль. Окрашивание DAPI выявляет морфологию ядра

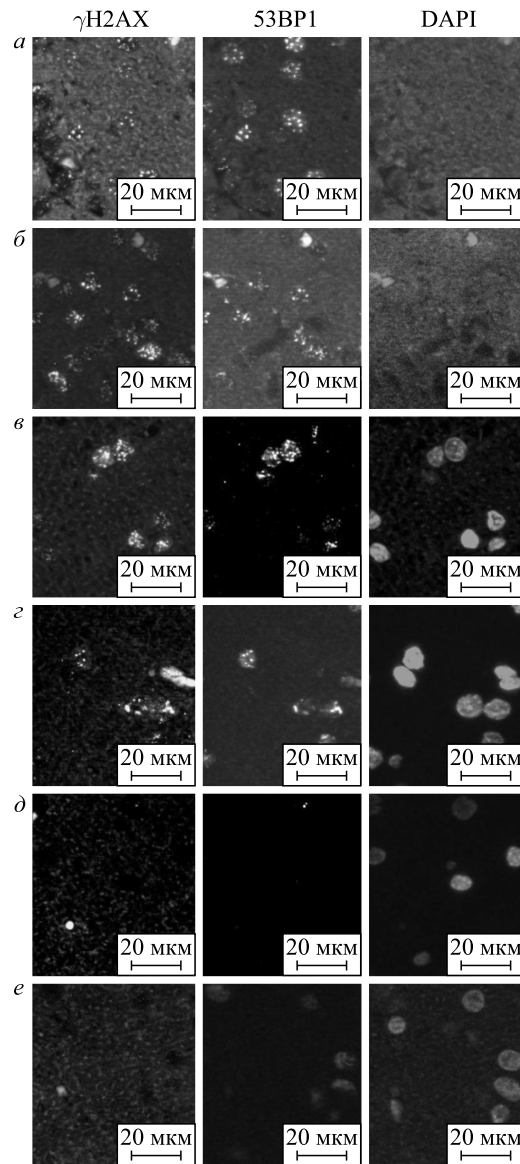


Рис. 4. Формирование γ H2AX и 53BP1 фокусов в клетках молекулярного слоя коры мозжечка после воздействия γ -квантов ^{60}Co в дозе: а — 1 Гр; б — 3 Гр; в — 5 Гр через 1 ч после облучения. Формирование-элиминация γ H2AX и 53BP1 фокусов молекулярного слоя коры мозжечка после воздействия γ -квантов ^{60}Co в дозе 3 Гр через: б — 1 ч; г — 4 ч; д — 24 ч; е — контроль. Окрашивание DAPI выявляет морфологию ядра. Изображения были получены при 400 \times увеличении

порядка нескольких десятков при дозах 3 и 5 Гр. Вместе с тем можно заметить, что в пострadiационный период происходит достаточно быстрая элиминация индуцируемых повреждений из клеток. У животных, облученных в дозе 3 Гр, через 4 ч наблюдается значительное снижение уровня γ H2AX/53BP1 фокусов и к 24 ч приближается к контрольному уровню (рис. 2, б). У контрольной группы животных отмечается крайне низкий уровень γ H2AX/53BP1 фокусов (рис. 3, е). Следует заметить, что большинство фокусов в клетках Пуркинье к 24 ч после облучения эффективно элиминируются, однако некоторые клеточные ядра содержат γ H2AX/53BP1 фокусы большего размера по сравнению с остальными (рис. 3, д). Схожая картина снижения уровня РИФ γ H2AX/53BP1 отмечалась в молекулярном и гранулярном слоях коры мозжечка (рис. 4). Качественный анализ показал, что уровень γ H2AX/53BP1 фокусов снижается со временем и к 24 ч остается малая часть клеточных ядер, содержащая 1–2 колокализованных РИФ на клетку (рис. 4, д).

Анализ препаратов показывает, что количество, яркость и степень колокализации РИФ γ H2AX/53BP1 зависит от типа клеток. РИФ γ H2AX в клетках Пуркинье меньше по размеру и интенсивности свечения по сравнению с окружающими клетками (рис. 3, в). Сходные по характеру радиационно-индуцированные γ H2AX фокусы в клетках Пуркинье наблюдались в работе [7]. Меньший размер этих фокусов может отражать релаксированное состояние хроматина в данных клетках, который удерживает фосфорилированные молекулы H2AX дальше друг от друга по сравнению с их более близким расположением в более конденсированном хроматине [7]. Об этом также может свидетельствовать бледная окраска ядра DAPI (рис. 3), что также связано с релаксированным состоянием хроматина. Сходная картина наблюдалась на органотипической ткани мозжечка в работе [7]. Было показано, что области в ядрах клеток Пуркинье, окрашенные с использованием флуоресцентных антител для белков-маркеров гетерохроматина HP1 α и H3K9me3, совпадают с областями плотной окраски DAPI. При этом области гетерохроматиновой окраски были крайне малы по сравнению с ядрами окружающих клеток. Это свидетельствует об особой организации гетерохроматина клеток Пуркинье и указывает

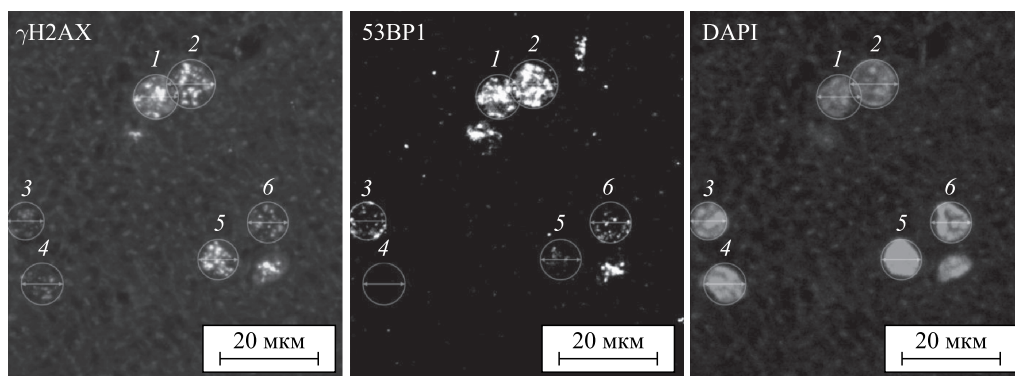


Рис. 5. Клетки молекулярного слоя коры мозжечка крыс после воздействия γ -квантов ^{60}Co в дозе 5 Гр через 1 ч после облучения при 400 \times увеличении. Клеточные ядра 1 и 2 содержат колокализованные маркеры γ H2AX и 53BP1; 4 — только γ H2AX; 3, 5 и 6 содержат оба маркера, но не демонстрируют колокализации

на то, что бóльшая часть хроматина находится в деконденсированном состоянии [7]. Также было отмечено, что определенные клеточные ядра в молекулярном слое коры содержали только маркер γ H2AX (рис. 5, клеточные ядра 4) или оба маркера γ H2AX и 53BP1, но колокализация отсутствовала (рис. 5, клеточные ядра 3, 5, 6). Это, вероятно, связано с тем, что эти ядра принадлежат клеткам глии. В работе [8] было показано, что белок 53BP1 не может быть использован в качестве универсального маркера ДР ДНК. Метод двойного иммуномечения, использованный в работе [8], не позволил локализовать белок 53BP1 с белками-маркерами для микроглии, астроцитов или олигодендроцитов в головном мозге крыс.

Таким образом, примененный нами при выполнении работы методический подход позволяет оценить в экспериментах *in vivo* индукцию и репарацию повреждений генетических структур в тканях нервной системы. Особый интерес будет представлять получение аналогичных данных при облучении животных тяжелыми заряженными частицами. Как известно, в этом случае в ДНК клеток формируются кластерные ДР ДНК в отличие от процесса воздействия излучений электромагнитной природы. Кластерные ДР ДНК — крайне тяжелые повреждения клеточного генома, трудно поддающиеся репарации. С учетом этого будет весьма важным изучить и эффективность формирования таких нарушений при действии частиц с возрастающими значениями линейных передач энергии, а также кинетику их репарации в пострadiационный период.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев А. И., Красавин Е. А., Островский М. А. К оценке риска биологического действия галактических тяжелых ионов в условиях межпланетного полета // Рос. физиол. журн. 2013. Т. 99, № 3. С. 273–280.
2. Shtemberg A. S., Kokhan V. S., Kudrin V. S., Matveev M. I., Lebedeva-Georgievskaya K. D., Timoshenko G. N., Molokanov A. G., Krasavin E. A., Narkevich V. B., Klodt P. M., Bazyan A. S. The Effect of High-Energy Protons in the Bragg Peak on the Behavior of Rats and the Exchange of Monoamines in Some Brain Structures // Neurochem. J. 2015. V. 9, No. 1. P. 66–72.
3. Britten R. A., Davis L. K., Johnson A. M., Keeney S., Siegel A., Sanford L. D., Singletary S. J., Lonart G. Low (20 cGy) Doses of 1 GeV/u ^{56}Fe -Particle Radiation Lead to a Persistent Reduction in the Spatial Learning Ability of Rats // Rad. Res. 2012. V. 177, No. 2. P. 146–151.
4. Hashimoto M., Hibi M. Development and Evolution of Cerebellar Neural Circuits // Develop. Growth Differ. 2012. V. 54. P. 373–389.
5. Manda K., Ueno M., Anzai K. Behavioural Memory Impairment, Oxidative Damage and Apoptosis Induced by Space Radiation: Ameliorative Potential of α -Lipoic Acid // Brain Res. 2008. V. 187. P. 387–395.
6. Podhorecka M., Skladanowski A., Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy // J. Nucl. Acids. 2010. V. 2010. P. 1–9.
7. Tzur-Gilat A., Ziv Y., Mittelman L., Barzilai A., Shiloh Y. Studying the Cerebellar DNA Damage Response in the Tissue Culture Dish // Mechanisms of Ageing and Development. 2012. V. 134. P. 496–505.
8. Torres G., Leheste J. R., Ramos R. L. Immunocytochemical Localization of DNA Double-Strand Breaks in Human and Rat Brains // Neuroscience. 2015. V. 290. P. 196–203.

Получено 23 июня 2017 г.