

На правах рукописи



АБДУЛЛАЕВ СЕРАЖУТДИН АБДУЛЛАЕВИЧ

**ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И
СТАБИЛИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА**

Специальность: 1.5.1. Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Научные консультанты:

Осипов Андреян Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий отделом экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Газиев Ажуб Ибрагимович – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории радиационной молекулярной биологии Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН

Официальные оппоненты:

Рубанович Александр Владимирович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экологической генетики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Васильев Станислав Анатольевич – доктор биологических наук, руководитель лаборатории инструментальной геномики Научно-исследовательского института медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Шарапов Марс Галиевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов рецепции ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уральский научно-практический центр радиационной медицины

Защита диссертации состоится «26» октября 2023 года на заседании Диссертационного совета 68.1.003.01 по адресу: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46, тел. +7(495)190-96-98

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, и на сайте: <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/dissertation-council>

Автореферат разослан «20» июля 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Н.К. Шандала

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности проблемы. Исследование структурно-функциональных нарушений генома в клетках человека и животных, подвергнутых воздействию ионизирующих излучений (ИИ), в настоящее время остается актуальным. основополагающие исследования по данной проблеме проводятся, ориентируясь на важнейшую мишень радиационного поражения – ядерную ДНК (яДНК). Однако известно, что в клетках млекопитающих кроме яДНК содержится и множество копий митохондриальной ДНК (мтДНК). В настоящее время ряд авторов считают, что мтДНК является более уязвимой мишенью клетки, по сравнению с яДНК, для эндогенных и экзогенных повреждающих агентов (Kam, et al. 2013, Maremonti, et al. 2020).

МтДНК в структурной организации и функционировании имеет ряд особенностей, отличных от яДНК. Так, мтДНК содержит гены, кодирующие белки системы дыхательной цепи (Amor and Hammadeh 2022, Mathuram, et al. 2022, Chowdhury, et al. 2022). Для нее характерна повышенная мутабельность, благодаря повреждениям, индуцируемым активными формами кислорода (АФК), генерируемыми в самих митохондриях, и ошибками репликативного синтеза (Nadalutti, et al. 2021, Coelho, et al. 2022, Roy, et al. 2022). В тканях (в том числе в постмитотических тканях мозга, сердца, скелетных мышц) мтДНК может реплицироваться независимо от клеточного цикла в течение всей жизни организма (Young, et al. 2021, Dahal, et al. 2022). Результаты многих исследований показывают, что при воздействии на клетки ИИ или химических мутагенов в мтДНК возникает в 3-50 раз больше повреждений, чем в соразмерном фрагменте яДНК (Gaziev 2013, Ip, et al. 2022). Процессы репарации ДНК в митохондриях клеток функционируют менее эффективно, чем в яДНК (Газиев и Подлущкий 2003, Gredilla, et al. 2010, Gaziev, et al. 2014). Если репликация поврежденной яДНК блокируется индуцибельной системой контроля клеточного цикла до завершения ее репарации, то эта система не блокирует репликацию поврежденной мтДНК в митохондриях (Cleaver 1992, Kulawiec, et al. 2009, Shimura, 2017). Возможно, именно по этим причинам в мтДНК наблюдается накопление мутаций с более высокой частотой, чем в яДНК (Skulachev 2006, Carvalho, et al. 2022).

Вместе с тем, хотя в радиобиологических исследованиях много внимания уделяется радиационно-индуцированному нарушению энергетического метаболизма, сведения по радиационному мутагенезу мтДНК в клетках человека или животных, подвергшихся воздействию ИИ, в литературе ограничены и противоречивы.

Стабильность и сохранение митохондриального генома, изменение количества копий мтДНК (дозы генов мтДНК) в клетках играют важную роль в адаптации человека к различным условиям внешней среды. С нарушениями мтДНК ассоциируются широкий спектр заболеваний, ослабление функций тканей, нарушения иммунной системы, развитие опухолевых патологий, старения (Cao, et al. 2022, Smith, et al. 2022, Chang, et al. 2023). Поэтому исследование возникновения, аккумуляции мутантных копий мтДНК и изменения количественного содержания копий мтДНК в

клетках тканей организма млекопитающих, подвергнутых воздействию ИИ, представляется актуальным и востребованным.

Целью диссертационной работы является исследование повреждений и восстановления мтДНК, наряду с яДНК, в различающихся по радиочувствительности тканях облученных животных, а также выяснение особенностей циркуляции внеклеточных ДНК (вк-ДНК) в биологических жидкостях в пострadiaционный период, с целью использования их в качестве неинвазивных биомаркеров оценки ответа организма на облучение и воздействие других генотоксических агентов, а также для оценки эффективности противолучевых средств.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Исследовать особенности восстановления мтДНК и репарацию яДНК, а также экспрессию генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, регуляции биогенеза и динамики митохондрий в трех участках головного мозга крыс (гиппокамп, кора больших полушарий, мозжечок) после облучения рентгеновскими лучами в разных дозах.
2. Определить общее количество фрагментов мтДНК, а также долю мутированных копий мтДНК в тканях мозга и селезенки мышей в зависимости от дозы облучения и длительности пострadiaционного периода (1-28 дней).
3. Исследовать изменение общего количества фрагментов вк-мтДНК, а также долю мутированных копий вк-мтДНК в плазме крови мышей в зависимости от дозы облучения и длительности пострadiaционного периода.
4. Определить общее количество фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК, а также долю мутированных копий вк-мтДНК в моче крыс в зависимости от дозы облучения или введения блеомицина.
5. Исследовать влияние мелатонина на митохондриальную дисфункцию и уровень восстановления мтДНК и репарацию яДНК в тканях коры мозга и селезенки облученных мышей.
6. Изучить влияние метформина на экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК, в моче облученных крыс, а также образование микроядер в клетках костного мозга и пострadiaционную выживаемость мышей.

Научная новизна. Впервые показано, что активность репарации яДНК, синтез мтДНК и уровень ее мутантных копий, а также модуляции экспрессии генов поддержки митохондрий, различны в гиппокампе, коре и мозжечке крыс после их облучения, что связано с различиями в радиочувствительности. В регионе гиппокампа наблюдался самый высокий уровень мтДНК с мутациями.

Впервые установлено, что в клетках тканей (головной мозг, селезенка) мышей, подвергнутых воздействию разных доз рентгеновского излучения, резко возрастает уровень мутантных копий мтДНК с максимумом на 8-й день после облучения с последующим снижением их содержания к 28-му дню пострadiaционного времени. Образование мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр).

Результаты анализов мутантных копий мтДНК головного мозга и селезенки облученных мышей показывают снижение количества мутантных копий мтДНК в пострadiационный период. В ткани селезенки этот процесс происходит более активно, чем в ткани головного мозга. Вместе с тем, общее количество копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей остается в течение всего времени наблюдения после облучения (8-28 дней) без изменения, хотя и ниже на 25-40% по сравнению с показателями контрольной (необлученной) группы (при дозе облучения 5 Гр).

Впервые установлено, что в кровоток облученных мышей в течение пострadiационного периода поступает большое количество циркулирующей вк-мтДНК, существенная часть которой представлена мутантными копиями. Уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови мышей зависит от дозы излучения. Динамика изменения общего содержания циркулирующей вк-мтДНК и уровня ее мутантных копий в плазме облученных мышей отличается от таковой в тканях селезенки и мозга этих же животных. Увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей совпадает со снижением их уровня в тканях этих же животных.

Впервые показана возможность преодоления трансрениального (почечного) барьера и перехода в мочу вк-мтДНК, наряду с вк-яДНК, у животных после воздействия рентгеновского излучения, а также после введения блеомицина. Обнаружена дозовая зависимость выявленных эффектов. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК мочи облученных крыс содержит мутантные копии.

В работе показано, что последствия радиационного воздействия можно снизить путем введения экзогенного мелатонина до и после радиационного воздействия. Показано, что, хотя ткани селезенки и коры головного мозга мышей отличаются исходными контрольными значениями анализируемых маркеров, антирадиационный потенциал мелатонина успешно реализуется в обеих тканях. Показано, что мелатонин эффективнее проявляет радиозащитные свойства как радиомитигатор.

Показано, что метформин действует как радиомитигаторный эффектор, способствуя активной экскреции вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой облученных крыс, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после воздействия ионизирующей радиации.

Таким образом, полученные результаты являются уникальными и приносят принципиально новые сведения о роли мтДНК в развитии радиационно-индуцированного ответа организма на облучение, а также о возможности использования такого критерия как уровень мтДНК в биологических жидкостях в качестве потенциального неинвазивного биомаркера оценки радиационного поражения и воздействия других генотоксических агентов на организм.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных по формированию радиационного мутагенеза мтДНК и изменению уровней мутантных копий мтДНК в тканях облученных животных в пострadiационный период, которые существенно дополняют знания о механизмах развития лучевой реакции организма.

Практическая значимость. Полученные результаты и использованные методические подходы внедрены в учебную деятельность ФГБОУ Пушинского государственного естественно-научного института и Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», в дальнейшем найдут применение в клинической практике при проведении мониторинга радиотерапии опухолей. Важным результатом, ориентированным на практическое использование, является обнаружение повышенного уровня общего количества фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК, а также увеличения содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме и моче облученных животных. Поскольку мтДНК является более уязвимой мишенью (чем яДНК) для ИИ и других генотоксических агентов, то повышенное содержание вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче животных после радиационного воздействия и влияния других генотоксикантов можно рассматривать как потенциальный чувствительный биомаркер для оценки радиационного поражения и наличия генотоксического груза.

Таким образом, практическая значимость данной диссертационной работы определяется возможностью разработки на основе внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях чувствительной неинвазивной быстрой тест-системы оценки клеточной гибели при действии радиации и других генотоксичных агентов, а также оценки эффективности противолучевых средств. Данная тест-система может быть востребована в учреждениях Федерального медико-биологического агентства и в радиологических и радиобиологических отделах прочих учреждений.

Методология и методы исследования. Полученные в ходе экспериментальных исследований данные были обработаны адекватными методами математической статистики с использованием современных компьютерных программ. При проведении исследований были использованы следующие методы:

- молекулярные методы выделения ДНК и РНК из тканей и биологических жидкостей;
- спектрофотометрические и флуориметрические методы определения концентраций ДНК и РНК;
- микроядерный тест;
- анализ выживаемости животных;
- амплификация методом классической ПЦР;
- метод обратной транскрипции для получения кДНК;
- амплификация методом количественной ПЦР-РВ;
- метод количественной ПЦР на протяженных фрагментах (ПЦР-ПФ) для определения повреждений ДНК;
- метод определения мутантных копий мтДНК с помощью специального набора Surveyor® Mutation Detection Kit;
- биохимические методы определения содержания перекиси водорода, АТФ, малонового диальдегида, глутатиона;

- статистические методы обработки полученных данных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Наличие в структурах головного мозга крыс повышенного уровня мутантных копий мтДНК (гетероплазмия) с одновременной активацией ее общего синтеза после радиационного воздействия, приводит к нарушению экспрессии генов, регулирующих синтез АТФ, усилению пролонгированного окислительного стресса в митохондриях и к их дисфункции.
2. Мутагенез мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр). Процесс снижения мутантных копий мтДНК быстрее протекает в активно пролиферирующих тканях (селезенка), чем в постмитотических тканях (головной мозг).
3. Резкое увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей связано со снижением их уровня в тканях этих же животных. Повышенное содержание мутантных копий вк-мтДНК и увеличение общей вк-мтДНК в плазме облученных животных зависит от дозы рентгеновского излучения и длительности пострadiационного периода.
4. Циркулирующие фрагменты вк-мтДНК и вк-яДНК, поступающие в кровоток облученных животных, могут преодолевать «почечный барьер» и переходить в мочу после действия радиации, а также после введения цитостатических препаратов на примере блеомицина. Выявлена дозовая зависимость этих процессов.
5. Введение экзогенного мелатонина до и после облучения способствует пострadiационной выживаемости животных, активации репарации ДНК и снижению митохондриальной дисфункции в тканях коры головного мозга и селезенки.
6. Метформин усиливает экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой, способствуя удалению поврежденных клеток из тканей облученных животных, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после действия ионизирующей радиации.

Достоверность результатов работы обеспечивается проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью; корректной статистической обработкой полученных данных и необходимым количеством повторных исследований, а также с применением современных методик, высококачественных расходных материалов и современного оборудования. Положения и выводы, сформулированные в диссертации, прошли апробацию на международных и российских научных конференциях и семинаров. Достоверность также подтверждается публикациями в рецензируемых научных отечественных и международных журналах: «Биофизика», «Биомедицинская Химия», «Радиационная биология. Радиоэкология», «Медицинская радиология и радиационная безопасность», «IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering», «Biology Bulletin», «Biogerontology», «Radiation and Environmental Biophysics», «Journal of Circulating Biomarkers», «Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis», «International Journal of Molecular Sciences», «Molecular Biology Reports», «Antioxidants» и др.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 1.5.1. Радиобиология, охватывающей п. 5 «Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны», п. 6 «Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток», п. 15 «Радиационная защита. Проблемы радиационной безопасности; радиозащита, радиомитигация и радиосенсибилизация. Биологическое действие радиопротекторов и радиосенсибилизаторов», в диссертационном исследовании представлены новые данные о закономерностях репарации и восстановлении яДНК и мтДНК в различных тканях животных, подвергнутых радиационному воздействию; изучены пути сохранения и стабилизации функций митохондрий и мтДНК в тканях облученных организмов; на основе внеклеточных яДНК и мтДНК в биологических жидкостях предлагается разработка нового неинвазивного быстрого метода оценки клеточной гибели при действии радиации и других генотоксических агентов.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены и представлены на отечественных и международных конференциях: ESF-EMBO Symposium «Spatio-Temporal Radiation Biology: Transdisciplinary Advances for Biomedical Applications» (Sant Feliu de Guixols, Spain, 2009); 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (Prague, Czech Republic, 2009); «38th Annual Meeting of the ERRS» (Stockholm, Sweden, 2010); Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пущино, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019); «Ломоносов» (Москва, 2014, 2015); «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пущино, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022); «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014); «VI, VII, VIII Съезды по радиационным исследованиям» (Москва, 2010, 2014, 2021); «Медико-биологические проблемы действия радиации» (Москва, 2012); «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиобиологии» (Санкт-Петербург, 2015); «VI Съезд радиобиологического общества Украины» (Киев, Украина, 2015); «V, VI Съезд биофизиков России» (Ростов-на-Дону, 2015; Сочи, 2019); «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 2016); «Современные проблемы общей и космической радиобиологии» (Дубна, 2017); «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2018); «Smart Bio» (Kaunas, Lithuania, 2018); «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, 2019); «16th IRR Congress» (Manchester, United Kingdom, 2019); «Современные проблемы радиобиологии» (Гомель, Беларусь, 2021); «American Association for Cancer Research Annual Meeting» (Philadelphia, USA, 2021, 2022); «Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии» (Дубна, 2022).

Результаты исследования получены при выполнении государственных контрактов и грантов, включая программы Президиума РАН «Фундаментальные

науки – медицине» и грантов РФФИ № 08-04-00163; № 12-04-31089; 13-04-00485; № 12-04-31070; № 16-34-00832; № 17-29-01007.

Личный вклад диссертанта в работу. Соискатель выполнял все этапы диссертационного исследования, включая формулирование цели, задач, положений и выводов, планирование и проведение исследований, статистический анализ и интерпретацию полученных экспериментальных данных. Соискателем подготовлены публикации в отечественные и международные профильные журналы, полученные результаты представлены на конференциях регионального, всероссийского и международного уровней.

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 55-ти печатных работах, из которых – 18 статей в журналах, рекомендуемых ВАК (11 статей в иностранных и 7 в российских) и 37 работ – в материалах российских и международных конференций, съездов и симпозиумов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 213 страницах, иллюстрирована 3 таблицами и 35 рисунками. Библиографический указатель содержит 443 источника литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, а также степень достоверности и апробация результатов исследования.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный следующим вопросам: 1) роль мтДНК в функционировании и стабильности клеток млекопитающих при действии ионизирующей радиации; 2) внеклеточная ДНК как потенциальный неинвазивный биомаркер оценки лучевой реакции организма; 3) влияние радиопротекторов на функционирование митохондрий и целостность мтДНК в облученных клетках.

Из анализа литературы следует, что результаты исследований по мутагенезу мтДНК в клетках тканей после радиационного воздействия на уровне целого организма ограничены и противоречивы. Это, прежде всего, требует проведения комплексного экспериментального исследования по анализу формирования мутаций мтДНК в клетках тканей облученных животных и по определению судьбы мутантных копий мтДНК в пострadiационный период.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объекты исследования

1.1. Лабораторные животные и их облучение. В работе использовались самцы мышей линии BALB/c 2-х месячного возраста (масса тела 30 г), а также самцы крыс линии Fisher-344 3-месячного возраста (масса тела 150 г), полученных из питомника филиала Института биоорганической химии РАН (Пушино, Московская обл.). Животных подвергали облучению на рентгеновской установке РТУ-12 (Медрентген, Россия) в дозах 3, 5 и 8 Гр. Краниальное облучение крыс проводили в дозах 3 и 5 Гр (протоны, $E = 150$ МэВ) на установке “Фазотрон” Медикотехнического комплекса Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ (Дубна). Содержание лабораторных животных осуществляли в теплых, сухих, светлых помещениях со свободным доступом к пище и воде. После эвтаназии у мышей исследовали разные ткани головного мозга (кора больших полушарий, гиппокамп, мозжечок), селезенки, костный мозг, кровь (плазма крови). Сбор мочи проводился у одних и тех же крыс до и после облучения. Эксперименты с животными проводили согласно распорядительному документу ЕСС Directive 2010/63/EU. Общее количество животных в экспериментах составляло 946 особей.

1.2. Приготовление и условия введения препаратов животным.

Мелатонин (“Sigma-Aldrich”, США) растворяли в кипяченой питьевой воде (комнатной температуры), содержащей 0,1% диметилсульфоксида (ДМСО). Конечные концентрации этого раствора составляли 2,5% мелатонин и 0,1% ДМСО. Раствор вводили мышам перорально в объеме 100 мкл, что соответствует дозам мелатонин 125 мг/кг и ДМСО 0,1 мг/кг массы тела мыши (Buege and Aust 1978). Также отдельно готовили 0,1% раствор ДМСО для введения контрольным группам мышей. Каждая отдельная группа состояла из пяти мышей. Мелатонин дополнительно вводили (0,3 мг/мл) в питьевую воду в течение 24 и 48 ч мышам, получавшим его основную дозу через 20 мин после облучения, учитывая короткий клиренс (Buege and Aust 1978). Блеомицин (Наукопрофи, Москва) вводили животным внутрибрюшинно в дозах 3, 7 и 10 мг/кг. Метформин (Merck, Darmstadt, Germany) вводили животным по 300 мг/кг веса тела перорально с питьевой водой. Мышам вводили метформин за 25 мин до и через 15 мин, 6, 24 ч после облучения.

2. Методы исследования

2.1. Пострадиационная выживаемость животных. Выживаемость животных контролировали в течение 30 дней после облучения, количество выживших мышей проверяли в одно и то же время каждый день. Все группы мышей в анализах выживаемости включали по 30 животных.

2.2. Микроядерный тест. Величину цитогенетических повреждений в клетках костного мозга мышей определяли по появлению полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), содержащих микроядра (МЯ). Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации через 24 ч после облучения. Клетки костного мозга ресуспендировали в сыворотке и готовили мазки, фиксировали метанолом и окрашивали методом May-Grunwald-Giemsa (Merck, Германия). Для каждой мыши было приготовлено 4

предметных стекла, всего 2000 полихроматических эритроцитов были подсчитаны для определения доли клеток костного мозга с микроядрами.

2.3. Выделение ДНК. Общую геномную ДНК из головного мозга и селезенки выделяли с использованием специальных наборов QIAGEN Genomic Tip Kit и Genomic DNA Buffer в соответствии с инструкциями производителя (“QIAGEN”, Германия). Внеклеточную ДНК из плазмы и мочи выделяли с помощью набора Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (“Promega”, США). Концентрацию выделенной ДНК определяли с использованием прибора Qubit (Invitrogen, США).

2.4. ПЦР-амплификация участков ДНК. ПЦР участков ДНК проводили на программируемом термоциклере Applied Biosystems 2720 (“Applied Biosystems”, США).

2.5. Метод количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК (ПЦР-ПФ). Определение повреждения и восстановления яДНК и мтДНК проводили с помощью метода количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК (ПЦР-ПФ) с использованием набора KAPA Long Range Hot Start Kit (KAPA Biosystems, США).

2.6. Определение мутаций мтДНК. Мутантные копии мтДНК в тканях определяли с помощью специального набора Surveyor Mutation Detection Kit (Transgenomic, США) в соответствии с инструкциями производителя.

2.7. Выделение РНК. Общая РНК из тканей была извлечена с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Москва) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли с использованием прибора Qubit (Invitrogen, США).

2.8. Обратная транскрипция для генов мРНК. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с помощью набора обратной транскриптазы MMLV (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

2.9. ПЦР в реальном времени. Содержание общего количества копий фрагментов мтДНК, относительно яДНК, а также копий мРНК проводили с помощью ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan на приборе Prism 7500 (“Applied Biosystems”, США).

2.10. Биохимические анализы. Для определения содержания перекиси водорода (H_2O_2) в тканях использовался набор Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit 165 (Sigma-Aldrich, США), согласно инструкциям производителя. Изменение содержания малонового диальдегида (МДА) в тканях определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), согласно методу Бюге и Ауста. Содержание восстановленного глутатиона оценивали по методу Элмана.

2.11. Статистическая обработка экспериментальных данных. Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, США). Для оценки значимости различий применяли критерий Стьюдента и непараметрические критерии Манна-Уитни. В экспериментах на выживание различия между группами сравнивали по точному критерию Фишера. Результаты исследований представлены как среднее

арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего ($\pm$ SEM). Статистическая значимость была установлена при $p \leq 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Результаты исследования репарации яДНК, восстановления уровня копий мтДНК, а также экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, регуляции биогенеза и динамики митохондрий в разных структурах головного мозга крыс (гиппокамп, кора, мозжечок) после воздействия рентгеновского излучения

В ходе выполнения данной работы были изучены репарация ядерной ДНК (яДНК) и изменения целостности митохондриальной ДНК (мтДНК), а также экспрессия генов, поддерживающих функции митохондрий, в трех областях головного мозга (гиппокамп, кора и мозжечок) крыс после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр.

На рисунке 1 представлены результаты анализов по оценке наличия повреждений и их репарации в мтДНК и яДНК в участках головного мозга (гиппокампа, коры и мозжечка) крыс, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения. На рисунке 1А представлены образцы электрофореграмм ПЦР-ПФ ампликонов мтДНК и яДНК, а на рисунке 1Б даны результаты количественного анализа полученных продуктов ПЦР-ПФ.

Можно видеть, что уровень синтезируемых продуктов ПЦР-ПФ яДНК и мтДНК, выделенных из участков головного мозга крыс через 2 часа после их облучения, существенно ниже по сравнению с таковым у контрольных (необлученных) крыс. Этот результат указывает на наличие повреждений в образцах яДНК и мтДНК облученных крыс. Результаты анализов показывают также, что количество амплифицируемых продуктов ПЦР-ПФ становится больше при введении в реакционную смесь образцов ДНК, выделенных из участков мозга крыс через 6 и 24 часа после их облучения.

Очевидно, что возрастание количества синтезированного продукта в реакциях с этими образцами ДНК обусловлено снижением повреждений, способных снижать активность ДНК-полимеразы.

Вместе с тем, видно, что синтез ампликонов мтДНК, при введении в реакцию образцов общей ДНК из трех участков мозга крыс, выделенных через 24 часа после их облучения, происходит более эффективно, чем таковой в реакции с яДНК. При этом синтез ампликонов мтДНК из всех трех участков мозга одинаково возрастает, достигая результатов, получаемых с контрольными образцами мтДНК. Однако, столь активного роста ПЦР-ПФ-ампликонов как с мтДНК, в случае реакции с яДНК, не наблюдалось. Более того, результаты, полученные с яДНК, из трех участков мозга различаются. В этом случае, статистически достоверные повышения продуктов ПЦР-

ПФ выявляются в реакциях с образцами яДНК из коры и мозжечка, по сравнению, с таковым с яДНК, выделенной из гиппокампа этих же крыс.

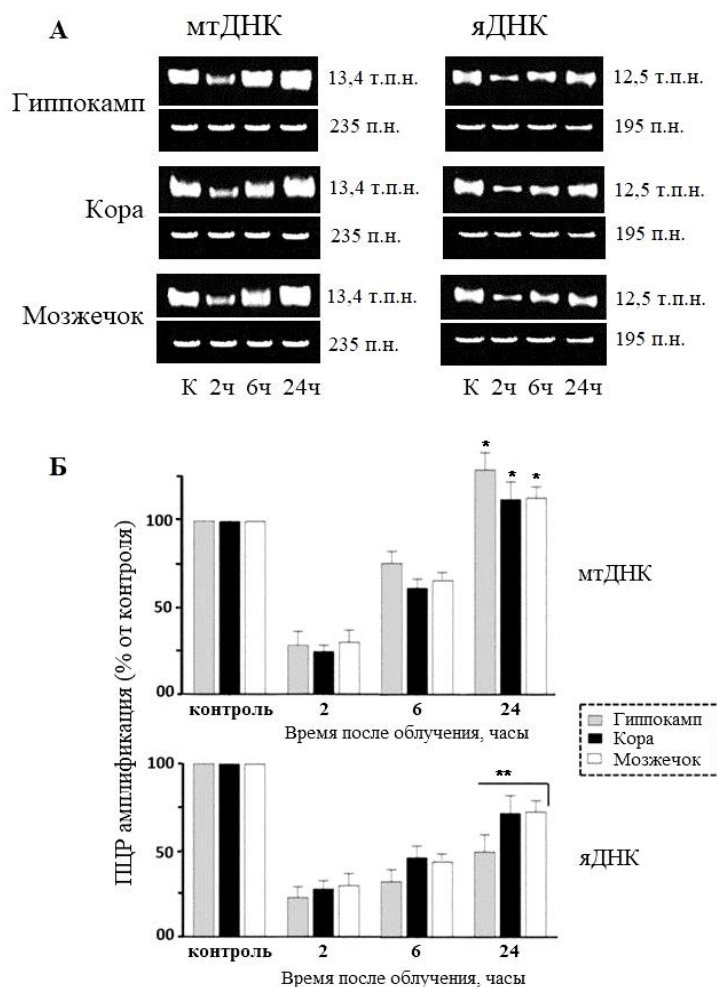


Рисунок 1 – Анализ повреждений и репарации мтДНК и яДНК в разных отделах головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Амплифицировали длинные фрагменты мтДНК (13,4 тыс. п.н.) и яДНК (12,5 тыс. п.н.). Эти данные были нормализованы к коротким фрагментам мтДНК (235 п.н.) и яДНК (195 п.н.), полученными с использованием того же образца ДНК. (А) – Гель-электрофорез продуктов ПЦР-ПФ мтДНК и яДНК, извлеченных из разных отделов головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после облучения (здесь и на других рисунках контроль – необлученные крысы). (Б) – Количественный анализ ампликонов ПЦР-ПФ мтДНК и яДНК, извлеченных из разных отделов головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Если полагать, что увеличение синтеза продукта ПЦР-ПФ яДНК в пострadiационный период обусловлено репарацией части ее повреждений, способных блокировать ДНК-полимеразу, то вряд ли это может быть связано с

относительно резким увеличением синтеза продуктов мтДНК из этих же тканей мозга. В данном случае можно полагать, что наблюдаемое увеличение продукта ПЦР-ПФ мтДНК обусловлено, скорее всего, пострадиационной активацией биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК в тканях мозга облученных крыс.

Предполагаемая пострадиационная активация биогенеза митохондрий согласуется с результатами анализов, полученных методом ПЦР в реальном времени, которые показывают, что количество копий мтДНК увеличивается относительно яДНК в регионах головного мозга крыс (гиппокамп, коры и мозжечок) в течение 6-24 часов пострадиационного времени (рис. 2). При инициации репликативного синтеза с вовлечением поврежденных мтДНК, посредством ДНК-полимеразы γ , можно было ожидать появление новых копий мтДНК с мутациями и делециями в клетках головного мозга крыс, после их облучения ИИ.

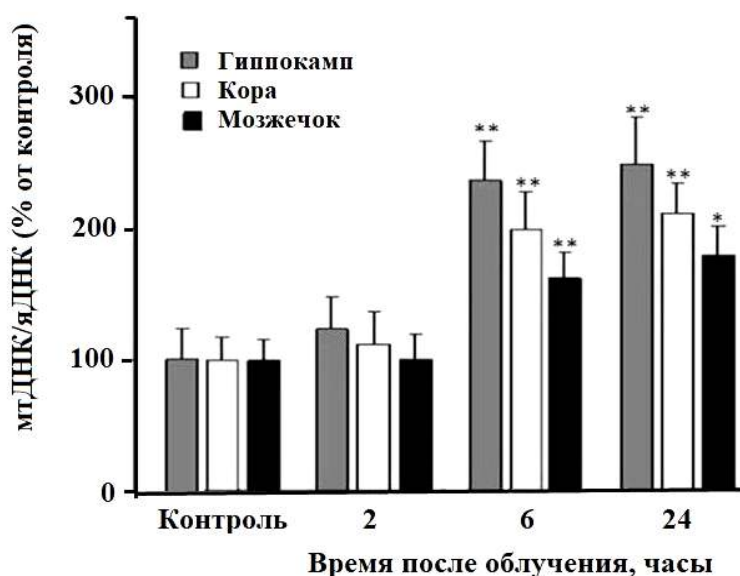


Рисунок 2 – Содержание фрагментов мтДНК, относительно яДНК в разных отделах головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результаты анализа количества мутантных копий мтДНК в разных отделах головного мозга крыс, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр, представлены на рисунке 3. Во всех трех структурах головного мозга облученных крыс возникает резкое увеличение относительного количества мутантных копий мтДНК (рис. 3А). Так, к 24 часам после облучения, количество мутантных копий мтДНК в участках мозга достигает около 10-20% от общего количества копий мтДНК в этих тканях (рис. 3Б).

В регионе гиппокампа наблюдается самый больший активный рост мтДНК с мутациями. Так, в гиппокампе обнаружено статистически достоверное повышение мутантных копий мтДНК, по сравнению с данными анализа мтДНК коры и мозжечка,

к 6 и 24 часам после облучения крыс (рис. 3Б). Аналогичные результаты по определению уровня мтДНК и их мутантных копий в разных тканях мозга крыс были получены после краниального воздействия протонов (150 MeV) в дозах 3 и 5 Гр (Абдуллаев и др. 2020).

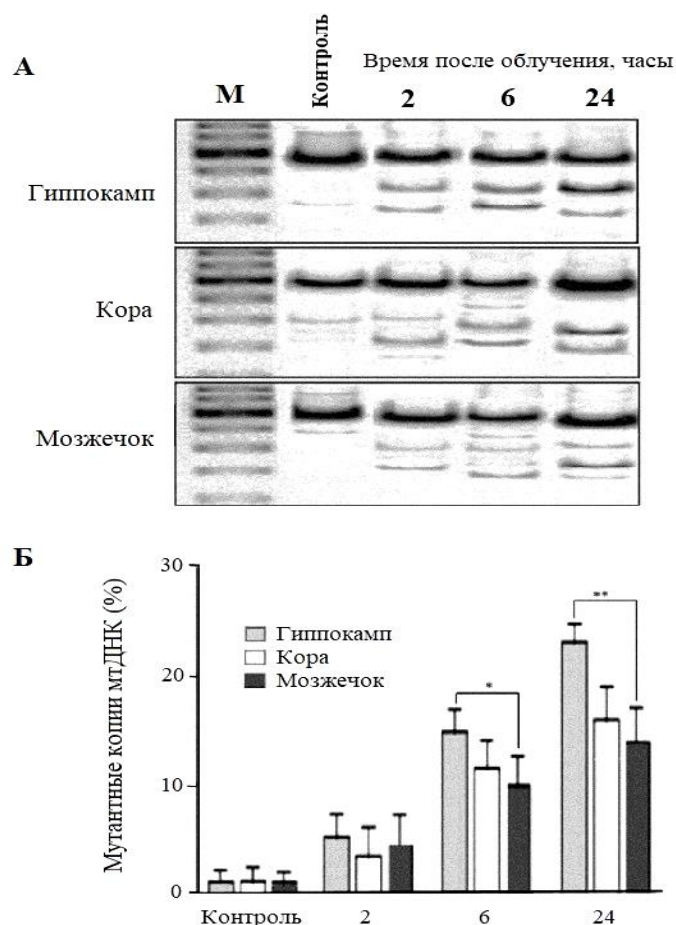


Рисунок 3 – Анализ мутантных копий мтДНК в разных отделах головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. (А) – Электрофореграммы продуктов расщепления нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (ген *tRNA*, 507 п.н.). (Б) – Процент расщепления нуклеазой гетеродуплексов. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результаты анализа экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, в трех областях мозга у крыс, облученных рентгеновским излучением, показаны на рисунке 4. Эти результаты включают информацию, полученную после анализа транскриптов генов, кодируемых мтДНК (*ND2* является компонентом комплекса I, а *CytB* является компонентом комплекса III), а также ядерным ДНК-кодируемым геном *ATP5O*, компонент комплекса V (субъединица АТФ-синтазы). По результатам анализов достоверное снижение экспрессии трех генов (*ND2*, *CytB*, *ATP5O*) регистрировалось во всех тканях мозга крыс через 24 часа

после их облучения. Более выраженное снижение экспрессии этих генов в постлучевой период наблюдается в гиппокампе и мозжечке (рис. 4).

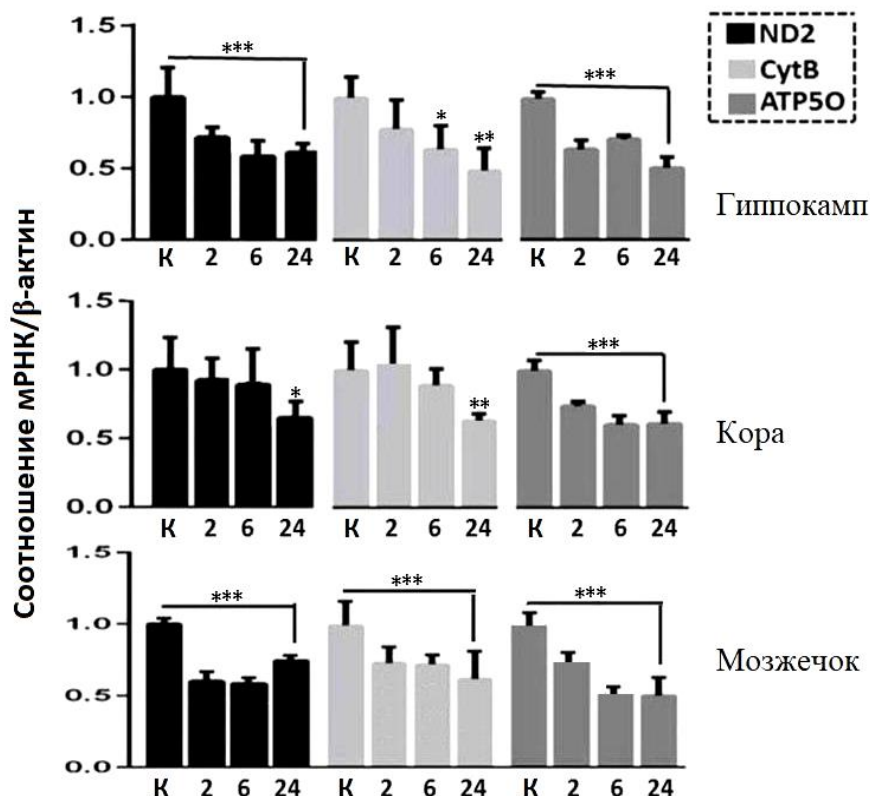


Рисунок 4 – Изменение экспрессии генов окислительного фосфорилирования (*ND2*, *CytB*, *ATP5O*) в различных отделах головного мозга крыс через 2, 6, 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. К – контрольные (необлученные крысы). Уровень экспрессии генов у необлученных крыс выражен как 1. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Результаты анализа экспрессии двух генов яДНК, кодирующих митохондриальный транскрипционный фактор А (*TFAM*) и гамма-коактиватор рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа (*PGC-1*), которые участвуют в регуляции репликации, транскрипции мтДНК и биогенезе митохондрий, представлены на рисунке 5.

На этом же рисунке представлены результаты анализа уровней транскриптов генов *Mfn1*, *Fis1*, регулирующих слияние и деление митохондрий. Полученные данные показывают, что к 24 часам пострадиационного времени происходит значительное увеличение транскриптов *TFAM* и *PGC-1* в трех областях головного мозга. Что касается генов *Mfn1* и *Fis1*, контролирующих слияние и деление митохондрий, то изменение их экспрессии регистрировалось только в гиппокампе. Снижение экспрессии *Mfn1* и *Fis1* в гиппокампе возникает через 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения (рис. 5).

Итак, в митохондриях в трех областях головного мозга после облучения в дозе 5 Гр происходит резкое снижение экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании. Кроме того, происходит увеличение активности ядерных генов, контролирующих митохондриальный биогенез в тканях мозга облученных крыс.

Таким образом, полученные результаты показывают, что репарация повреждений яДНК в различных отделах мозга крыс после их облучения протекает медленно. Однако наблюдается активация синтеза мтДНК с повышенным уровнем гетероплазмы (мутантных копий мтДНК).

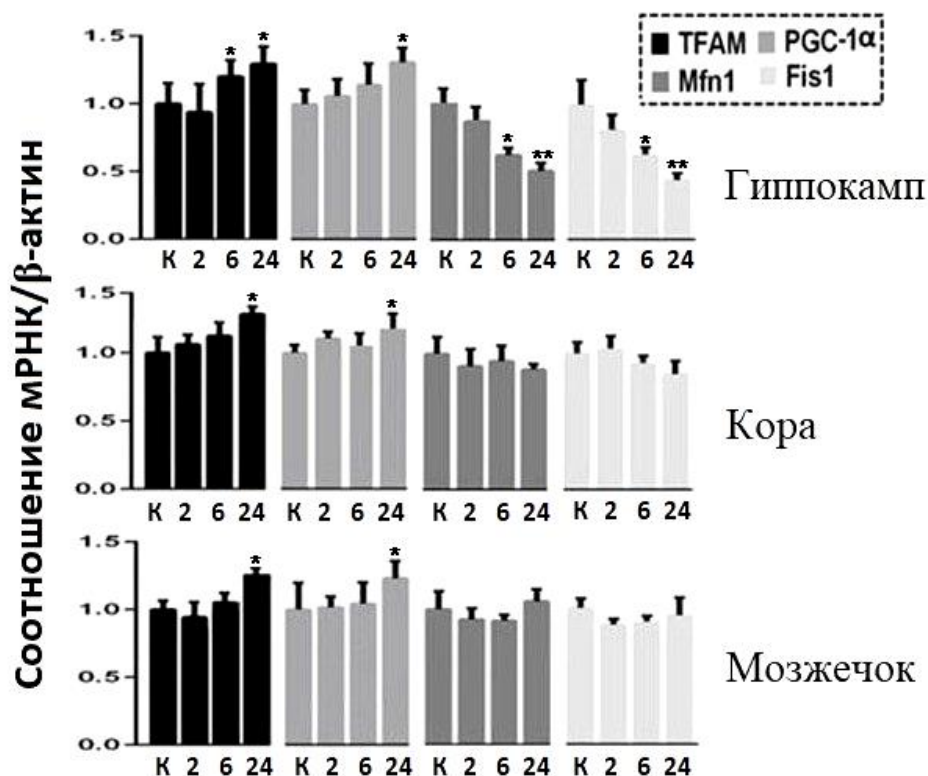


Рисунок 5 – Изменение экспрессии генов регуляции биогенеза, транскрипции (*TFAM*, *PGC-1α*) и динамики митохондрий (*Mfn1*, *Fis1*) в различных отделах головного мозга крыс через 2, 6, 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. К – контрольные (необлученные крысы). Уровень экспрессии генов у необлученных крыс выражен как 1. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Очевидно, увеличение количества копий мтДНК является результатом активации ядерных генов, контролирующих биогенез митохондрий. Можно полагать, что повышенный уровень гетероплазмы мтДНК приводит к пертурбации работы комплексов окислительного фосфорилирования и генерации повышенного уровня АФК, которые индуцируют дополнительные повреждения яДНК. Снижение экспрессии ядерных генов, регулирующих динамику митохондрий, вероятно,

способствует уменьшению элиминации поврежденных органелл из ткани мозга, воздействуя, прежде всего, на клетки гиппокампа. Наблюдаемые изменения в разных областях головного мозга крыс, подвергшихся радиационному воздействию, могут привести к развитию отсроченных эффектов облучения. В связи с этим дальнейшие анализы уровня гетероплазмы мтДНК были проведены в более поздние сроки после воздействия рентгеновского излучения.

3.2. Определение уровней мутантных копий и общего количества копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки мышей в зависимости от дозы облучения и пострadiaционного периода

На рисунке 6 представлены анализы содержания мутантных копий мтДНК в тканях мозга и селезенки мышей, облученных рентгеновскими лучами (в дозах 1-5 Гр). Из представленных данных, видно, что с увеличением дозы облучения мышей увеличивается и доля мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки. Как показано на кривых, если максимальные значения содержания мутантных копий мтДНК (% расщепления гетеродуплексов) регистрируется на 8-й день после облучения мышей, то в последующие пострadiaционные сроки (14, 28 дни) можно видеть их резкое снижение.

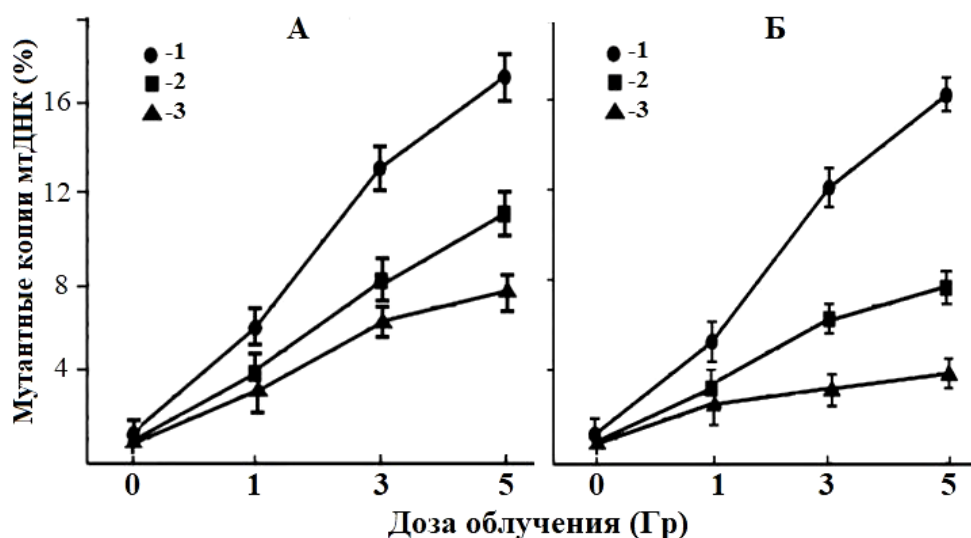


Рисунок 6 – Содержание мутантных копий мтДНК (ген *D-loop 2*) в тканях головного мозга (А) и селезенки (Б) мышей после облучения в разных дозах. По оси абсцисс – доза облучения (Гр), по оси ординат – % расщепления гетеродуплексов. 1, 2, 3 - время после облучения через 8, 14, 28 дней.

Причем, это снижение более активно происходит в ткани селезенки, чем в ткани мозга. Наблюдаемое снижение мутантных копий мтДНК в тканях облученных мышей в пострadiaционный период, возможно, связано с их селективной элиминацией или со снижением общего содержания копий мтДНК в этих тканях. Для

выяснения этого вопроса необходимо было определить динамику изменения общего содержания копий мтДНК в тканях облученных мышей.

Изменение общего содержания копий мтДНК (по гену *ND4*) относительно яДНК (ген *GAPDH*) в тканях головного мозга и селезенки мышей после их облучения в дозах 1-5 Гр представлены на рисунке 7.

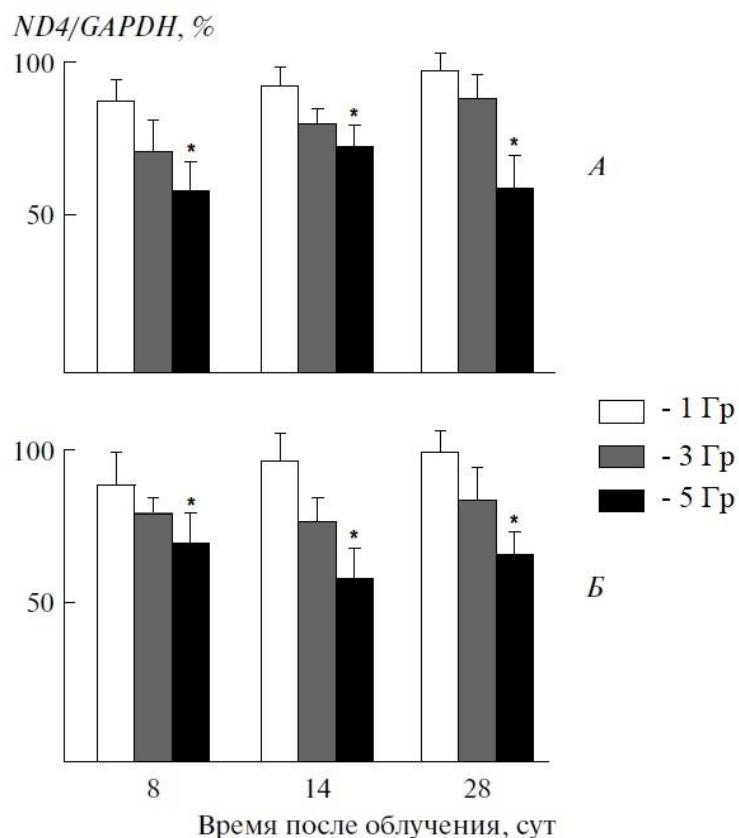


Рисунок 7 – Изменение отношения количества копий мтДНК (ген *ND4*) к количеству яДНК (ген *GAPDH*) в мозге (А) и селезенке (Б) мышей, облученных в дозах 1, 3 и 5 Гр. По оси абсцисс (8, 14, 28) - дни после облучения; по оси ординат - отношение *ND4* к *GAPDH* в процентах. За 100% приняты данные контрольных мышей. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$.

Видно, что статистически значимых изменений количества копий мтДНК в тканях мышей не регистрируется после их облучения (на 8-28 дни) в дозах 1 и 3 Гр. Однако содержание общего количества копий мтДНК в тканях облученных мышей (в дозе 5 Гр) на 25-40% достоверно ниже данных контрольной группы (рис. 7).

Таким образом, был обнаружен повышенный уровень мутантных копий мтДНК в тканях облученных мышей, который снижается в последующие сроки пострadiaционного времени. Вместе с тем, зарегистрирован относительно стабильный уровень общего количества мтДНК в тканях облученных мышей в

пострадиационный период, хотя он остается существенно ниже (при дозе облучения 5 Гр), чем в тканях контрольных животных.

3.3. Изменения количества внеклеточных мутантных копий и общего содержания копий мтДНК в плазме крови мышей в пострadiационный период

На рисунке 8А представлены образцы электрофореграмм гетеродуплексов ПЦР-ампликонов участка *D-loop* 2 вк-мтДНК плазмы после их инкубации с “Surveyor” нуклеазой. Вк-мтДНК, использованная в этих анализах (рис. 8), получена из плазмы мышей через 8, 14, 28 дней после облучения в дозах 1-5 Гр.

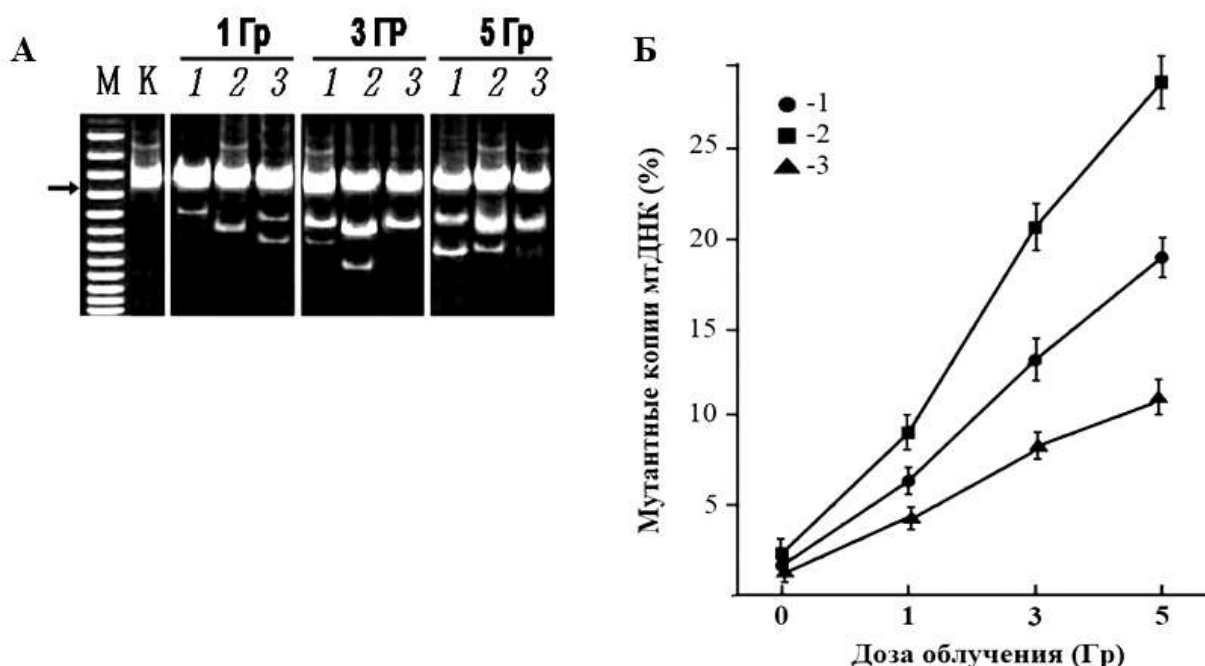


Рисунок 8 – Анализ мутантных копий вк-мтДНК в плазме крови облученных мышей (в дозах 1, 3 и 5 Гр). (А) Электрофореграммы продуктов расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (ген *D-loop* 2, 437 п.н.). (Б)

Процент расщепления нуклеазой гетеродуплексов. 1, 2, 3 – гетеродуплексы ампликонов мтДНК облученных мышей соответственно через 8, 14, 28 дней после облучения. К – гетеродуплексы ампликонов мтДНК необлученных мышей.

Можно видеть, что гетеродуплексы ПЦР-ампликонов вк-мтДНК плазмы необлученных мышей не подвержены существенному расщеплению “Surveyor” нуклеазой. Однако гетеродуплексы, полученные из ампликонов вк-мтДНК облученных мышей (в дозах 1-5 Гр), частично расщепляет “Surveyor” нуклеаза. Анализы электрофореграмм позволили определить процент ферментативного расщепления гетеродуплексов (рис. 8Б).

Из представленных данных видно, что возрастание доли мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей зависит от дозы облучения. Однако следует отметить, что доля мутантных копий вк-мтДНК в составе общей циркулирующей вк-

ДНК плазмы облученных мышей значительно выше, чем в составе общей ДНК, выделенной из тканей этих же мышей (рис. 6). Более того, здесь мы видим иной характер изменения уровня содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме мышей в пострadiaционный период. Если в тканях облученных мышей максимальное содержание мутантных копий мтДНК наблюдается на 8-й день после облучения (рис. 6), то наибольшее количество вк-мтДНК с мутациями в плазме мы регистрируем на 14-й день после облучения (рис. 8). Однако, доля мутантных копий вк-мтДНК в составе циркулирующей ДНК плазмы крови мышей, как и в тканях, также резко снижается на 28-й день после их облучения.

На рисунке 9 представлены результаты анализов содержания общего количества копий фрагментов вк-мтДНК в плазме мышей после их облучения в дозах 1-5 Гр.

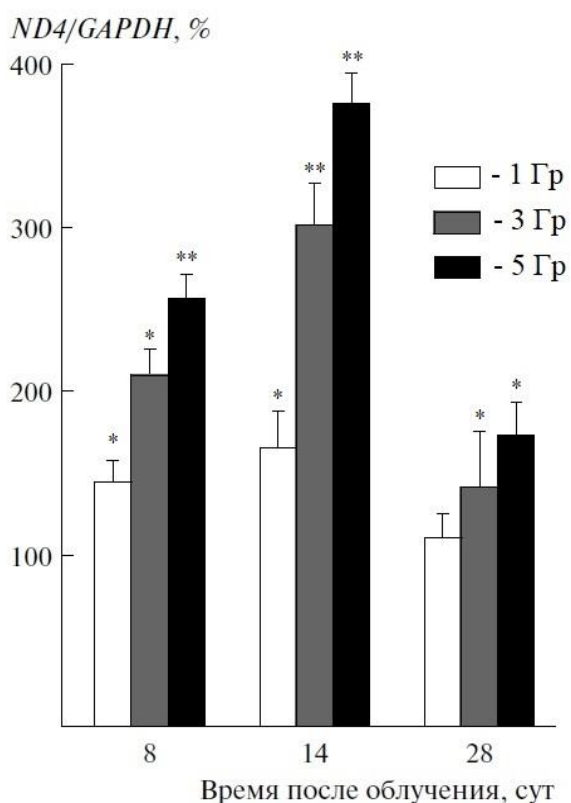


Рисунок 9 – Отношение количества копий вк-мтДНК (ген *ND4*) к количеству вк-яДНК (ген *GAPDH*) плазмы мышей, облученных в дозах 1, 3 и 5 Гр. По оси абсцисс: (8, 14, 28) дни после облучения; по оси ординат: отношение *ND4/GAPDH* в процентах. За 100% приняты данные контрольных мышей. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

В этих опытах наблюдался повышенный уровень вк-мтДНК в плазме крови облученных мышей, по сравнению с данными от контрольных животных, особенно на 8 и 14 дни пострadiaционного периода. Видно, что содержание вк-мтДНК в составе циркулирующей ДНК плазмы у мышей зависит от дозы облучения и времени

после облучения (рис. 9). При этом максимальное повышение количества копий мтДНК в плазме крови облученных мышей было, как и при анализе мутаций мтДНК, на 14 день пострadiaционного времени. Опять же, резкое снижение содержания вк-мтДНК в плазме мышей регистрируется на 28 день относительно данных, полученных на 14 день после их облучения.

Таким образом, содержание мтДНК с мутациями в тканях и в плазме облученных мышей резко меняется не только в зависимости от дозы облучения животных, но и от времени после облучения. Полученные данные позволяют полагать, что в кровоток облученных мышей в течение длительного пострadiaционного периода поступает значительное количество вк-мтДНК, определенная часть которой представлена мутантными копиями.

3.4. Исследование содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения и цитостатического препарата блеомицина

Циркулирующие фрагменты вк-мтДНК и вк-яДНК, поступающие в кровоток облученных животных, возможно, подвергаются нуклеазной деградации, но определенная ее часть, защищенная от действия нуклеаз, может оказаться в моче, как трансренальная ДНК (Umansky and Tomei 2006).

Моча является традиционно широко используемым материалом, который содержит огромное разнообразие продуктов метаболизма, чрезвычайно удобных для поиска специфических биомаркеров для диагностики различных патологий (Bouatra, et al. 2013). Исследования вк-мтДНК и вк-яДНК в моче для прогностической и диагностической оценки патологии имеют очевидные преимущества, относительно таких же исследований с использованием плазмы/сыворотки как источника этих же образцов вк-ДНК животных или человека (Umansky and Tomei 2006, Melkonyan, et al. 2008, Liu, et al. 2013). Поэтому дальнейшие эксперименты были посвящены исследованию возможности перехода через “почечный барьер” вк-мтДНК, наряду с вк-яДНК в мочу мышей, подвергнутых радиационному воздействию, а также выявлению изменений их количественного содержания и уровня гетероплазмии.

На рисунке 10 представлены данные изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, собранной до их облучения и после облучения (в дозах 3 и 5 Гр) в разные сроки пострadiaционного периода (от 6 часов до 10 дней).

Видно, что содержание вк-мтДНК и вк-яДНК в моче после облучения сначала возрастает, достигая максимума на 12-24-е часы. В последующие же сроки после облучения (72 и 240 часов) происходило значительное понижение количества копий как вк-мтДНК, так и вк-яДНК. Причем, одинаковая зависимость изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче в пострadiaционный период характерна при облучении крыс в дозах 3 и 5 Гр.

Полученные результаты также показывают, что при облучении в указанных дозах и при всех сроках пострadiaционных анализов содержание количества

амплифицируемых копий вк-мтДНК в 2-3 раза выше, по сравнению с таковым вк-яДНК в моче крыс (рис. 10).

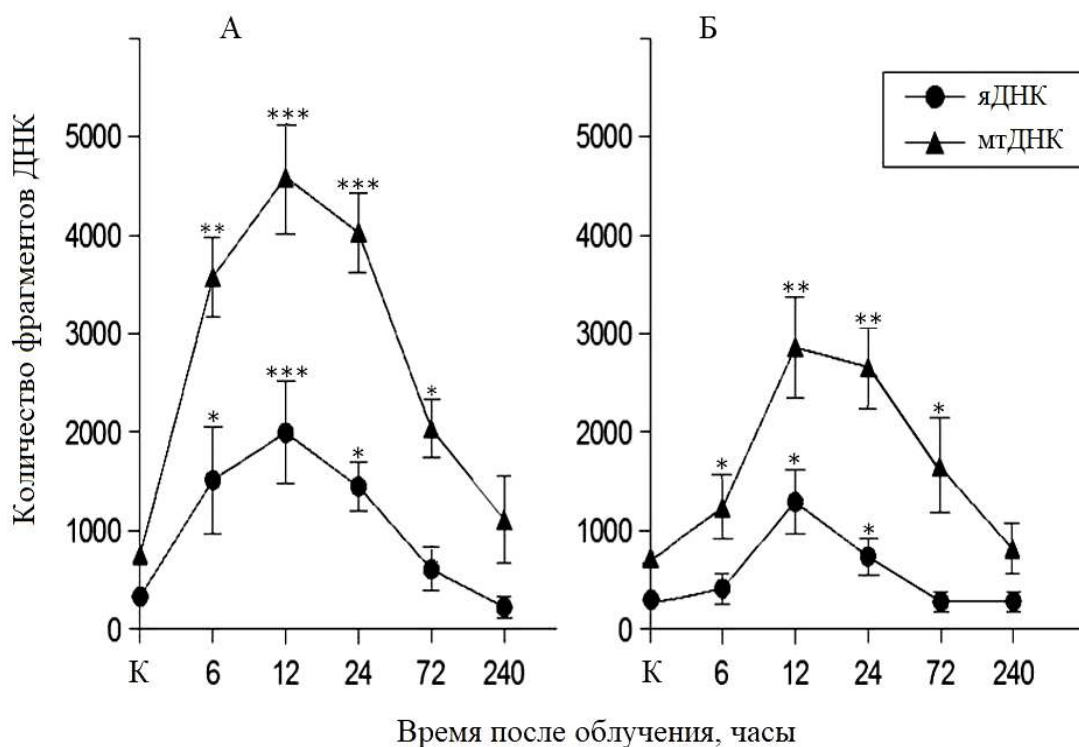


Рисунок 10 – Различие содержания фрагментов вк-мтДНК (ген *tRNA*) и вк-яДНК (ген *GAPDH*) в моче крыс, собранной до и после воздействия рентгеновского излучения. (А) – крысы, облученные в дозе 5 Гр; (Б) – крысы, облученные в дозе 3 Гр. Ордината – количество фрагментов ДНК (в относительных единицах); по оси абсцисс – время после облучения. К – контроль (вк-ДНК мочи крыс, собранной до облучения животных). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (n=8). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Как было отмечено, ранее мы наблюдали в составе вк-мтДНК плазмы облученных мышей увеличение доли мутантных копий, выявляемых методом “Surveyor” нуклеазой. Анализы вк-мтДНК, изолируемых в составе общей вк-ДНК из мочи облученных крыс показывают, что трансрэнальная вк-ДНК также содержит определенный процент мутантных копий фрагментов вк-мтДНК (рис. 11). Здесь представлены типичные образцы электрофореграмм гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (по гену *tRNA*) после их обработки “Surveyor” нуклеазой (рис. 11). Суммарное количество продукта, отщепленного “Surveyor” нуклеазой от гетеродуплексов, регистрируемое в данных анализах, характеризует соответствующий процент мутантных копий в составе образцов вк-мтДНК, изолируемых из мочи облученных крыс.

Процент мутантных фрагментов вк-мтДНК в моче крыс, облученных в дозе 5 Гр, как можно было ожидать, больше, чем в образцах мочи облученных крыс в дозе 3 Гр.

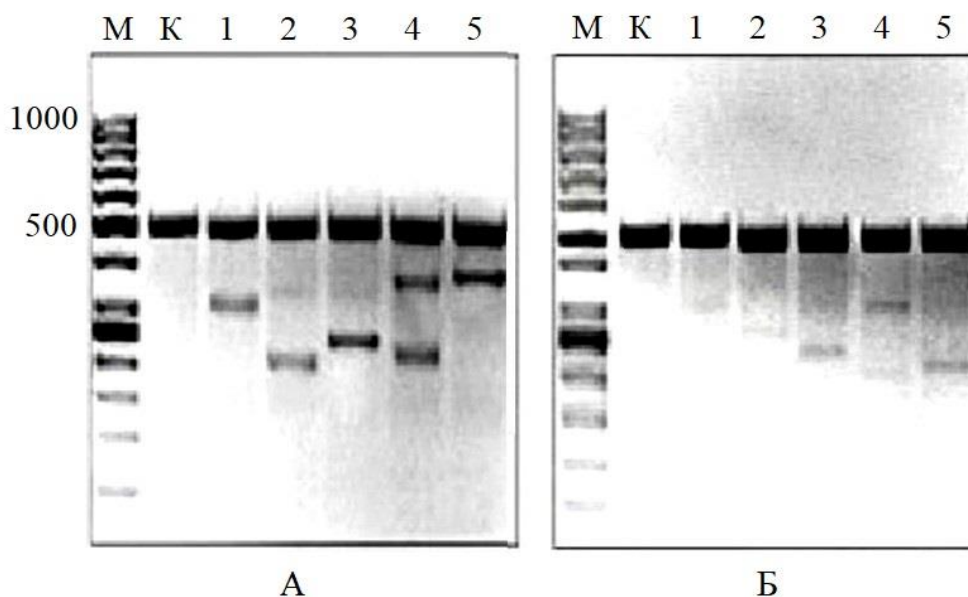


Рисунок 11 – Электрофорез продуктов расщепления Surveyor нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов вк-мтДНК из мочи крыс, собранной до облучения (К – контроль) и после облучения (1-5), соответственно 6, 12, 24, 72 и 240 часов. (А) – 5 Гр, (Б) – 3 Гр.

Как видно из рисунка 12, наибольший процент содержания мутантных копий вк-мтДНК регистрируется в образцах ДНК, изолированных из мочи крыс, собранных через 72 часа после их облучения, хотя максимальное повышение общего содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс наблюдается к 12 часам пострadiационного времени. Это позволяет предположить, что сроки формирования мутаций на поврежденных копиях мтДНК клеток тканей облученных животных не сопряжены с активным началом клеточной гибели.

Таким образом, полученные данные позволяют полагать, что в мочу крыс, подвергнутых радиационному воздействию, в течение длительного пострadiационного периода, поступает повышенное количество вк-мтДНК и вк-яДНК. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше, по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК из мочи облученных крыс содержит мутации, выявляемые с помощью метода “Surveyor” нуклеазы.

Обобщенные результаты независимых повторных анализов продуктов, отщепляемых “Surveyor” нуклеазой от гетеродуплексов вк-мтДНК, представлены на рисунке 12. Видно, что в составе вк-мтДНК мочи крыс, собранных до их облучения, содержания мутантных копий мтДНК не регистрируется. Согласно результатам представленных анализов, в моче крыс, после их облучения рентгеновскими лучами (в дозах 3 и 5 Гр), содержание мутантных копий вк-мтДНК резко повышается.

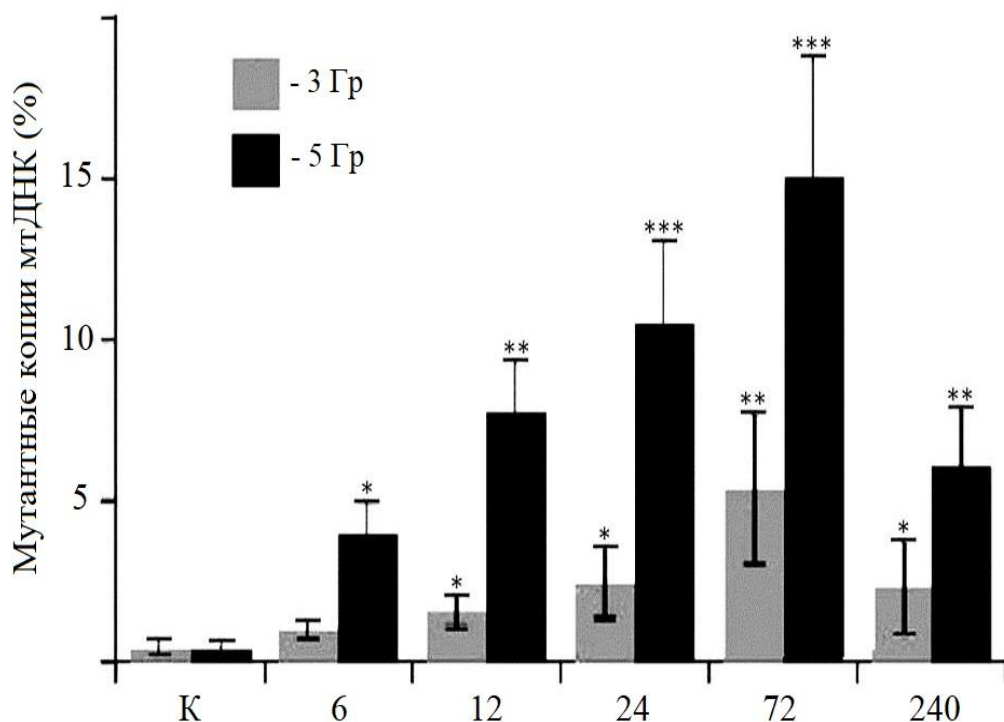


Рисунок 12 – Процент расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов вк-мтДНК из мочи крыс, собранной до облучения (К-контроль), и через 6, 12, 24, 72, 240 часов после облучения в дозах 3 и 5 Гр. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (n=8). Статистическая значимость была установлена при значениях* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Следующие исследования были посвящены изучению пострadiaционного изменения содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс как облученных в широком диапазоне доз, так и после введения животным клинически применяемых доз блеомицина – химиотерапевтического препарата ДНК-тропного воздействия.

Результаты анализов изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, собранных до и после их облучения (в дозах 3, 5 и 8 Гр) в разные сроки пострadiaционного времени (от 6 до 72 ч) представлены на рисунке 13. Эти результаты показывают, что уровни вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс существенно изменяются в зависимости от дозы облучения и пострadiaционного времени. Видно, что содержание вк-мтДНК и вк-яДНК в моче после облучения статистически значимо возрастает, достигая максимума на 12–24-е часы пострadiaционного времени. При этом одинаковая зависимость изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче в пострadiaционный период характерна при облучении крыс во всех исследуемых дозах (рис. 13 а, б). В последующие же сроки после облучения (72 ч) наблюдалось значительное понижение количества копий как вк-мтДНК, так и вк-яДНК в моче этих крыс. Зависимости количества вк-мтДНК и вк-яДНК от дозы облучения крыс описывались линейными функциями (рис. 13 в).

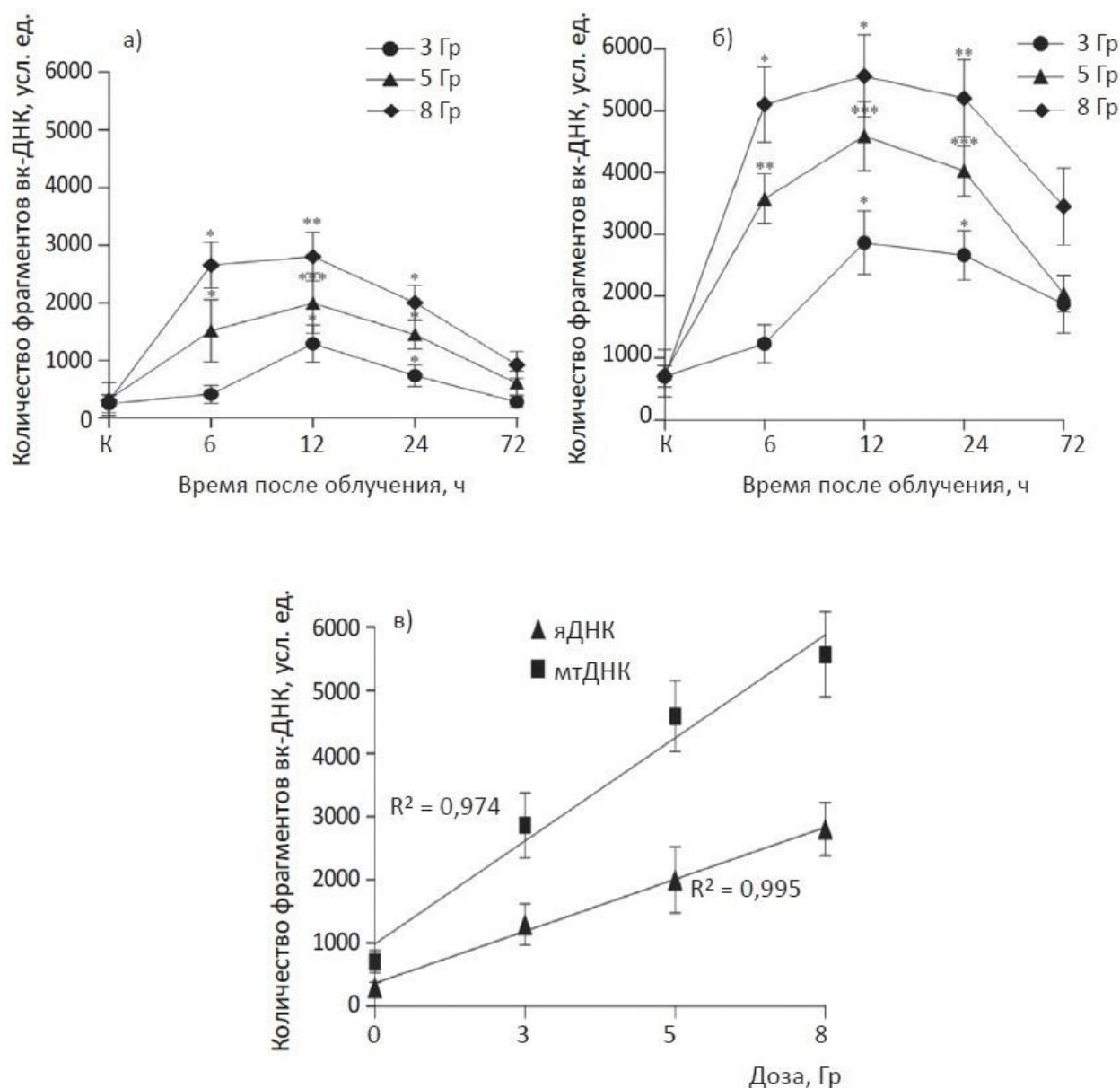


Рисунок 13 – Содержание фрагментов внеклеточной ДНК в моче крыс до и после воздействия рентгеновского излучения в дозах 3, 5 и 8 Гр. (а) – содержание фрагментов вк-яДНК; (б) – содержание фрагментов вк-мтДНК; (в) – содержание фрагментов вк-ДНК в зависимости от дозы облучения (12 часов); К – контроль (до облучения). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

На рисунке 14 показаны результаты количественного анализа содержания внеклеточной яДНК и мтДНК в образцах мочи крыс в разные сроки после внутрибрюшинного однократного введения блеомицина в дозах 3, 7 и 10 мг/кг. Видно, что после внутрибрюшинного введения крысам блеомицина также происходит увеличение содержания фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК, однако менее выраженное по сравнению с экспериментами по облучению крыс.

Статистически значимое повышение содержания вк-ДНК в моче крыс происходит по мере нарастания дозы введенного блеомицина. Так, максимальное количество копий мтДНК и яДНК регистрировалось на 12-24-е часы после введения препарата. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс имеет линейную зависимость от дозы блеомицина (рис. 14 в). Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК выше по сравнению таковым вк-яДНК.

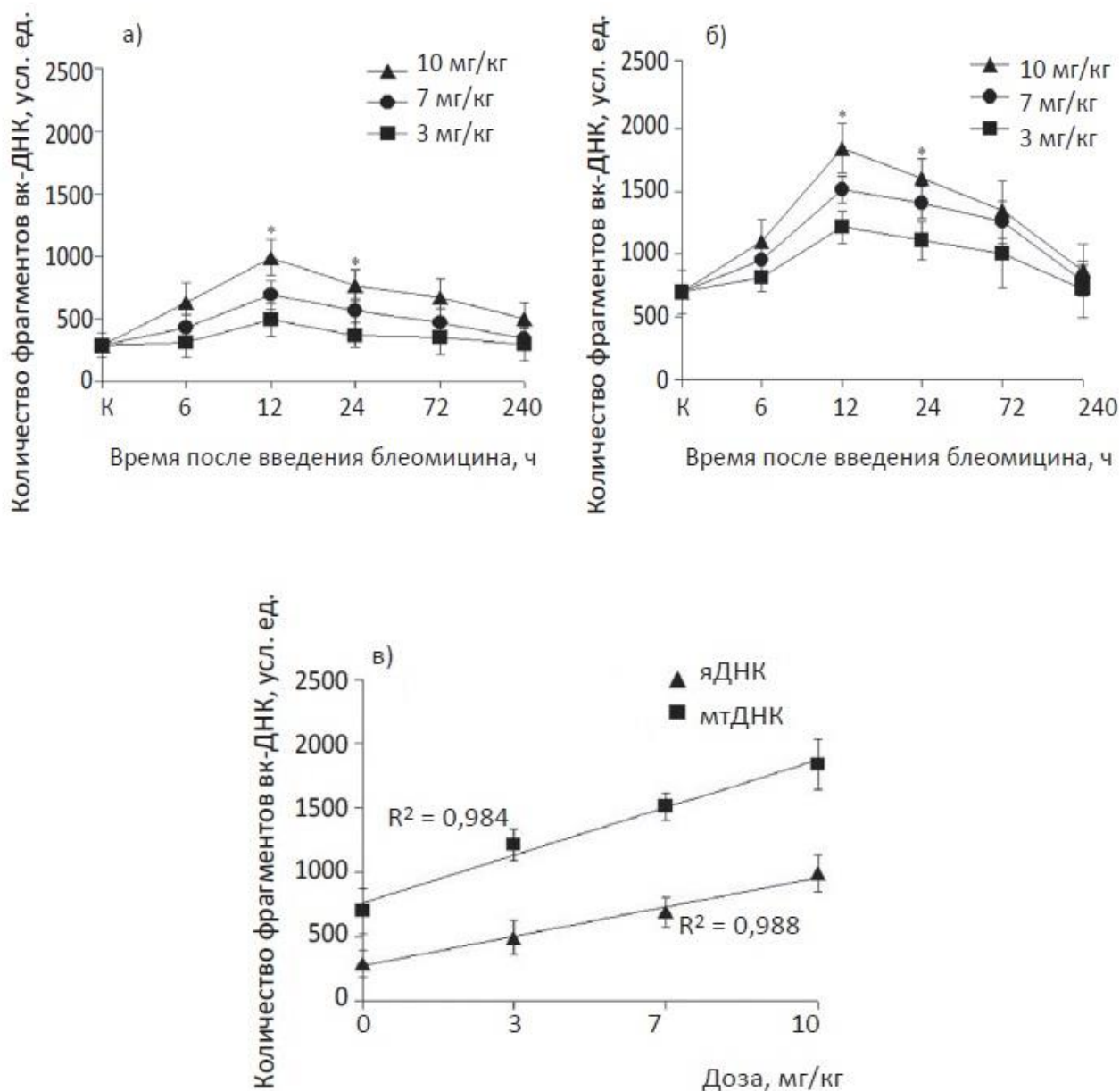


Рисунок 14 – Содержание фрагментов внеклеточной ДНК в моче крыс до и после введения блеомицина в дозах 3, 7 и 10 мг/кг. (а) – содержание фрагментов вк-яДНК; (б) – содержание фрагментов вк-мтДНК; (в) – содержание фрагментов вк-ДНК в зависимости от дозы введения блеомицина (12 часов); К – контроль (до введения препарата). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что количественные изменения вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс характеризуются линейной зависимостью от дозы облучения, а также от дозы химиотерапевтического препарата блеомицина. Данные исследования содержания циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в моче открывают новые возможности рассматривать их как потенциальные биомаркеры для неинвазивной оценки развития реакции организма на облучение и генотоксического действия средств химиотерапии опухолей.

3.5. Исследование радиопротекторных и радиомитигаторных эффектов мелатонина в тканях коры головного мозга и селезенки мышей при облучении

Результаты множества исследований указывают, что в качестве одного из наиболее активных антиоксидантов-радиопротекторов для снижения радиационных повреждений можно рассматривать мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин), подавляющий эффекты воздействия ИИ *in vitro* и *in vivo* (Choudharya, et al. 2019). В настоящее время мелатонин клинически применяется как препарат, нормализующих циркадные ритмы, а также все чаще находят его применение в качестве адъюванта при лучевой терапии опухолей (Gurunathan, et al. 2021, Moloudizargary, et al. 2021).

Поэтому настоящее исследование было посвящено сравнительной оценке ряда маркеров повреждений в тканях коры головного мозга и селезенки после облучения всего тела мышей рентгеновскими лучами и возможности модуляции этих повреждений при введении мелатонина до (режим радиопротекции) и после (режим радиомитигации) их облучения.

На рисунке 15 (в гистограммах) представлены результаты ПЦР-ПФ анализов по оценке наличия повреждений и их репарации в яДНК (8,7 тыс. п.н.) и мтДНК (10,9 тыс. п.н.) тканей селезенки и коры больших полушарий головного мозга мышей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. На рисунке 15 показаны также результаты ПЦР-ПФ анализов яДНК и мтДНК из этих же тканей мышей, которым вводили мелатонин до облучения и после облучения.

Над гистограммами представлены образцы типичных электрофореграмм ПЦР-ПФ ампликонов яДНК и мтДНК, а также электрофореграммы продуктов амплификации контрольных коротких фрагментов яДНК (110 п.н.) и мтДНК (117 п.н.). Продукты амплификации длинных участков яДНК и мтДНК из тканей необлученных мышей приняты как контроль за 100%. Видно, что уровень синтезированных продуктов ПЦР-ПФ яДНК и мтДНК из селезенки и коры мозга мышей через 15 мин после их облучения, значительно ниже по сравнению с таковым у необлученных мышей. Такое снижение продуктов ПЦР-ПФ указывают, что эти амплифицируемые участки яДНК и мтДНК содержат повреждения, способные блокировать ДНК-полимеразу быстрого запуска ПЦР КАРА Long Range (КАРА Biosystems).

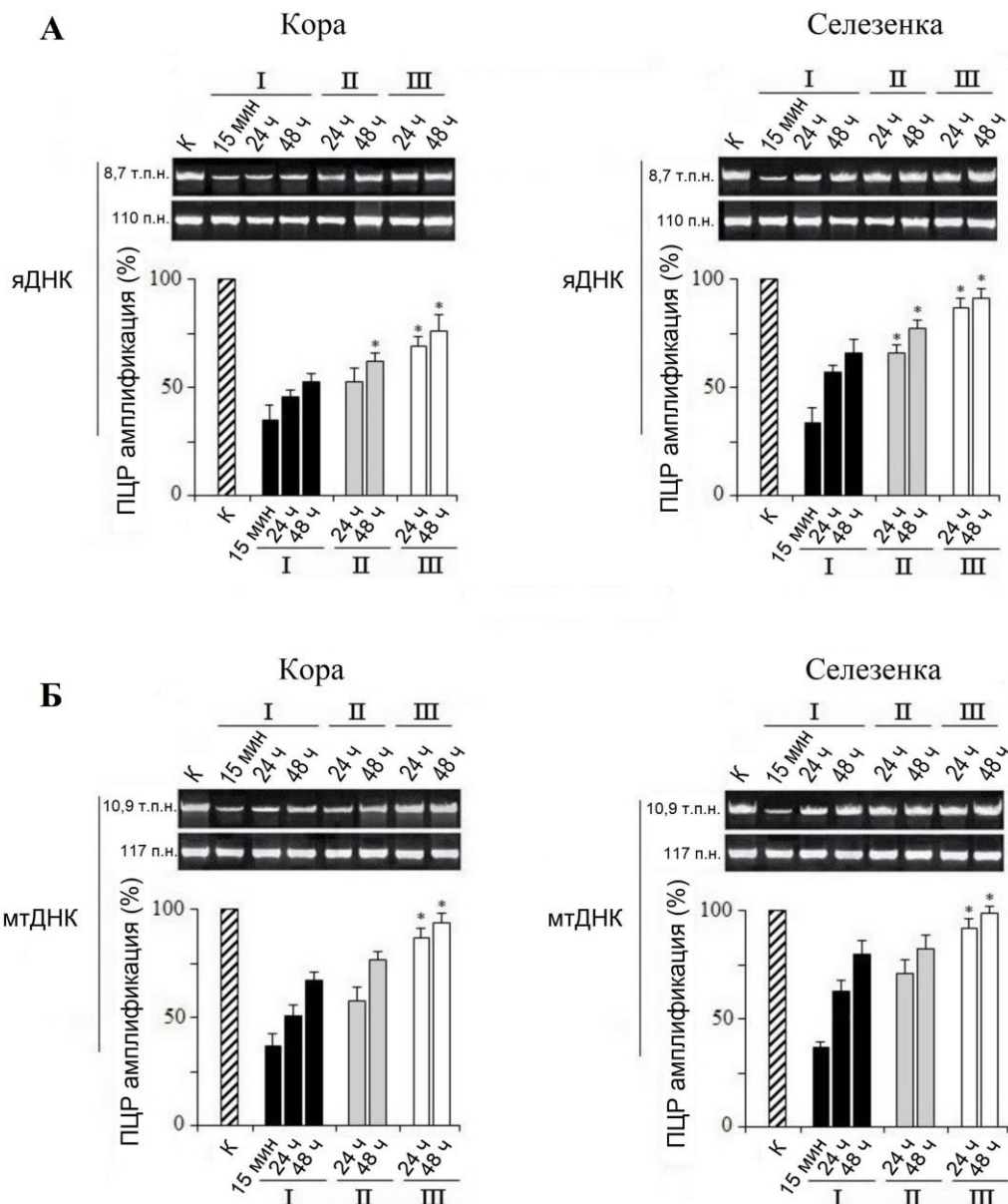


Рисунок 15 – Анализ повреждений и репарации яДНК и восстановление мтДНК. Амплифицировали длинные фрагменты яДНК (8,7 тыс. п.н.) и мтДНК (10,9 тыс. п.н.). Эти данные были нормализованы к коротким фрагментам яДНК (110 п.н.) и мтДНК (117 п.н.), полученными с использованием того же образца ДНК. (А) – Количественный анализ ампликонов ПЦР-ПФ яДНК ткани коры головного мозга и селезенки. (Б) – Количественный анализ ампликонов ПЦР-ПФ мтДНК ткани коры головного мозга и селезенки. Данные представлены в % от контроля (К). Мышей подвергали воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр, мелатонин вводили мышам до и после облучения в однократной дозе 125 мг/кг. Цифры (15 мин, 24 часа, 48 часа) сверху и снизу обозначают время после облучения. I – мыши без введения мелатонина; II – введение мелатонина до облучения; III – введение мелатонина после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$.

Дальнейшее сохранение низких уровней амплификации этих участков яДНК и мтДНК указывает на наличие в них не репарированных повреждений. Однако к 24 и 48 часам пострадиационного времени наблюдается увеличение продуктов ПЦР-ПФ, что указывает на функционирование процессов репарации повреждений ДНК. Согласно полученным данным, в тканях мышей, получавших мелатонин до и после облучения, количество повреждений яДНК и мтДНК достоверно меньше. Это указывает на то, что мелатонин способствует снижению повреждений ДНК. Можно видеть, что репарация яДНК более активно происходит в тканях селезенки и коры мозга мышей, получавших мелатонин после облучения (в режиме радиомитигатора).

При сравнении данных амплификации ПЦР-ПФ яДНК, у облученных и получавших мелатонин мышей, видно, что в ткани селезенки в указанные сроки пострадиационного времени процесс репарации яДНК протекает более активно, чем в коре мозга. На основе результатов эксперимента можно заключить, что мтДНК в селезенке и коре мозга восстанавливается активно, особенно у мышей, получивших мелатонин после облучения. Однако если увеличение синтеза продукта ПЦР-ПФ яДНК в течение постлучевого периода обусловлено репарацией повреждений яДНК, которые ингибируют КАРА Long Range ДНК-полимеразу, то вряд ли это будет причиной резкого увеличения синтеза продуктов ПЦР-ПФ мтДНК из тех же тканей мышей.

Известно, что в митохондриях млекопитающих эффективно функционирует только эксцизионная репарация оснований ДНК (Moretton, et al. 2017). Более того, двунитевые разрывы (ДНР) мтДНК в клетках млекопитающих не репарируются (Реева, et al. 2018, Zhao 2019), и мтДНК с возникновением ДНР может подвергаться деградации (Golpich, et al. 2017). Поэтому, скорее всего, мы в данном эксперименте регистрируем активацию биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК.

Для проверки этого предположения, были продолжены эксперименты по выяснению влияния мелатонин на количественное содержание мтДНК относительно яДНК в тканях селезенки и коры мозга мышей, подвергнутых радиационному воздействию. Изменение числа копий мтДНК или соотношения мтДНК/яДНК является важнейшим критерием оценки митохондриального биогенеза в тканях или клетках (Andres, et al. 2017, DeBalsi, et al. 2017).

Результаты анализов, полученные методом ПЦР в реальном времени, показывают, что количества копий мтДНК увеличиваются в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 24 и 48 часов после их облучения в дозе 5 Гр, по сравнению с данными группы контрольных (необлученных) животных (рис. 16). Судя по количеству копий мтДНК, усиление синтеза мтДНК более выражено в ткани селезенки, чем в коре мозга облученных мышей. Эти результаты подтверждают высказанное предположение о возможности активации биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК в тканях облученных мышей. Вместе с тем, видно, что при введении мелатонина синтез молекул мтДНК происходит менее активно, по сравнению с данными, полученными у облученных мышей без введения мелатонина. По-видимому, мелатонин частично подавляет индуцируемый ИИ синтез мтДНК в тканях

коры головного мозга и селезенки. При этом эффект подавления, индуцированного ИИ синтеза мтДНК при введении мелатонина животным после их облучения более выражен по сравнению с данными группы мышей, которым вводили мелатонин до облучения.

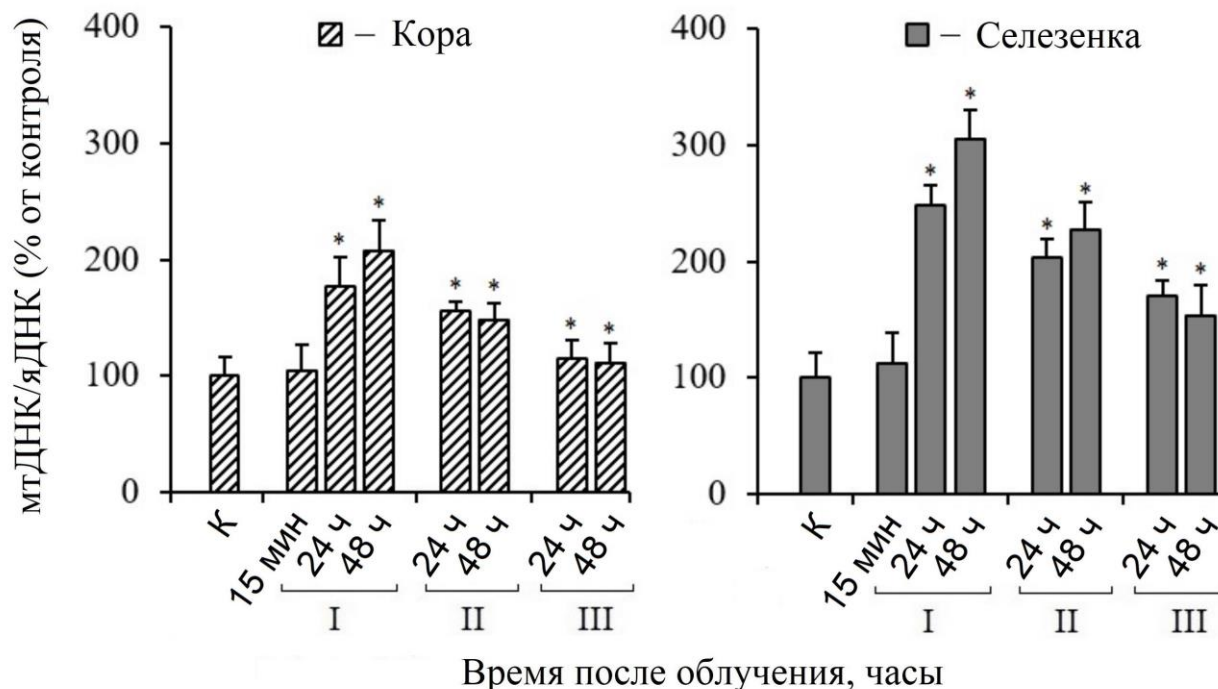


Рисунок 16 – Содержание фрагментов мтДНК (ген *ND4*), относительно яДНК (ген *GAPDH*) в тканях коры головного мозга и селезенки мышей, облученных в дозе 5 Гр. Цифры (15 мин, 24 часа, 48 часа) обозначают время после облучения. I – мыши без введения мелатонина; II – введение мелатонина до облучения; III – введение мелатонина после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что при инициации репликативного синтеза, с вовлечением поврежденных мтДНК-матриц, с участием ДНК-полимеразы γ и ДНК-полимеразы- θ в митохондриях (Collins, et al. 2012, Wisnovsky, et al. 2018) можно ожидать появление новых копий мтДНК с мутациями и делециями в тканях мышей, после их облучения ИИ.

На рисунке 17А показаны электрофореграммы продуктов расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК из тканей селезенки и коры мозга мышей, не получавших и получавших мелатонин (до и после облучения).

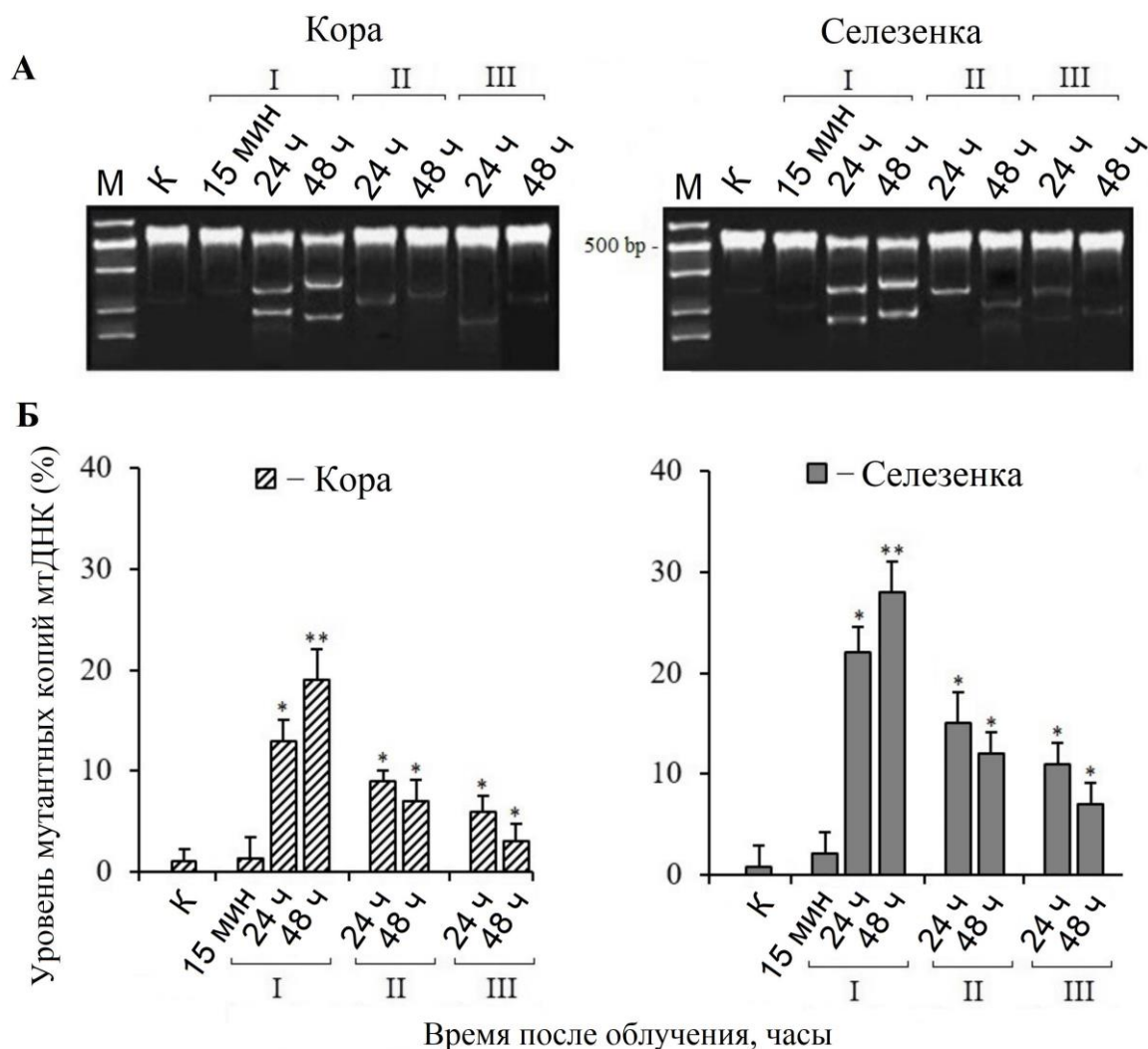


Рисунок 17 – Анализ мутантных копий мтДНК в тканях коры головного мозга и селезенки у мышей через 15 мин, 24 и 48 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. (А) Электрофореграммы продуктов расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (ген *ND3*, 534 п.н.). (Б) Процент расщепления нуклеазой гетеродуплексов. I – мыши без введения мелатонина; II – введение мелатонина до облучения; III – введение мелатонина после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов.

Статистическая значимость была установлена на уровне

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Количественный анализ продуктов расщепления гетеродуплексов показал, что в тканях селезенки и коры мозга мышей значительно увеличивается уровень мутантных копий мтДНК в течение 24-48 часов после облучения (рис. 17Б). Так, количество мутантных копий в ткани коры мозга к 48 часам пострадиационного времени возрастает до 20%, а в ткани селезенки до 30%, относительно контроля. С другой стороны, в тканях мышей, получавших мелатонин до облучения и после облучения, данные по результатам анализов количества мутантных копий мтДНК существенно меньше по сравнению с таковыми результатами от мышей, не

получивших мелатонин. Следует также отметить, что значительное снижение количества мутантных копий мтДНК регистрируется в ткани коры головного мозга при введении мелатонина мышам после их облучения, по сравнению с данными, полученными в селезенке облученных мышей, получавших мелатонин. Таким образом, показано, что в процессе пострadiaционного биогенеза митохондрий часть синтезированных молекул мтДНК являются мутантными копиями (рис. 17).

На рисунке 18 можно видеть, что активность продукции пероксида водорода (H_2O_2) более резко возрастает в ткани селезенки облученных мышей в течение 24-48 часов пострadiaционного периода. Вместе с тем, при введении мелатонина существенно снижается уровень H_2O_2 в селезенке. В ткани коры мозга тенденция изменения содержания пероксида водорода такая же, как в селезенке, но менее выражена. Можно видеть, что после облучения мышей происходит повышение уровня H_2O_2 через 15 минут в ткани мозга и этот уровень сохраняется в течение 24 и 48 часов. Вместе с тем, наблюдалось снижение уровня пероксида водорода в ткани коры мозга мышей, которым вводили мелатонин, только к 48 часам после облучения.

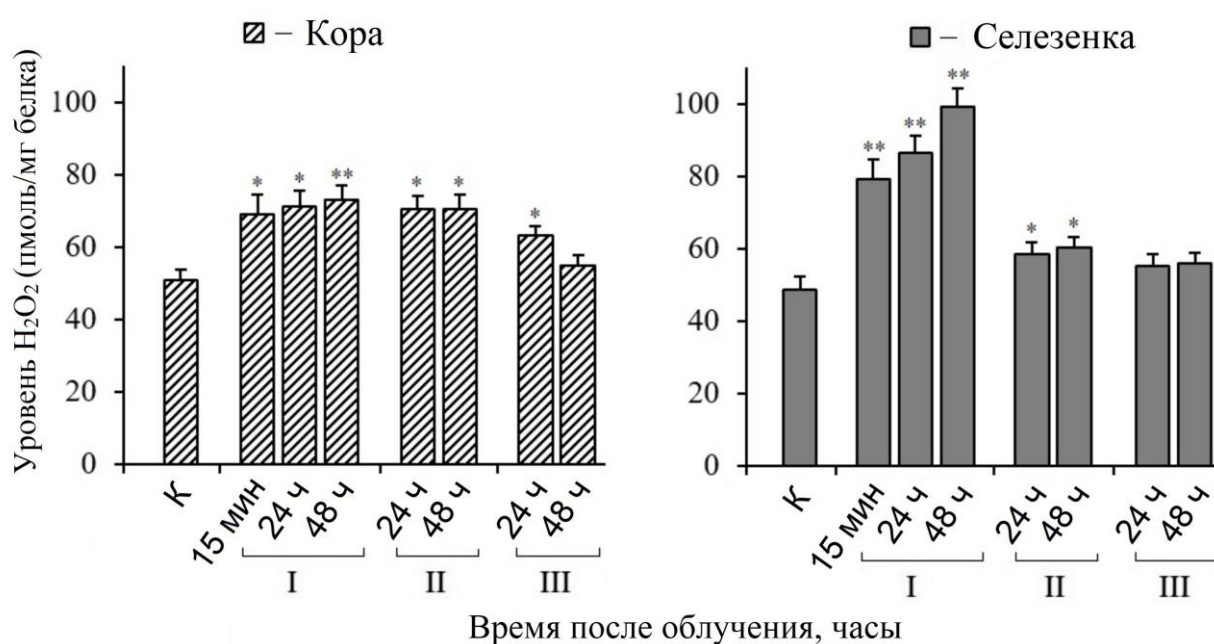


Рисунок 18 – Изменение содержания пероксида водорода (H_2O_2) в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения мелатонина; II – введение мелатонина до облучения; III – введение мелатонина после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

На рисунке 19 представлены результаты анализа изменения продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида в тканях коры мозга и селезенки мышей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения.

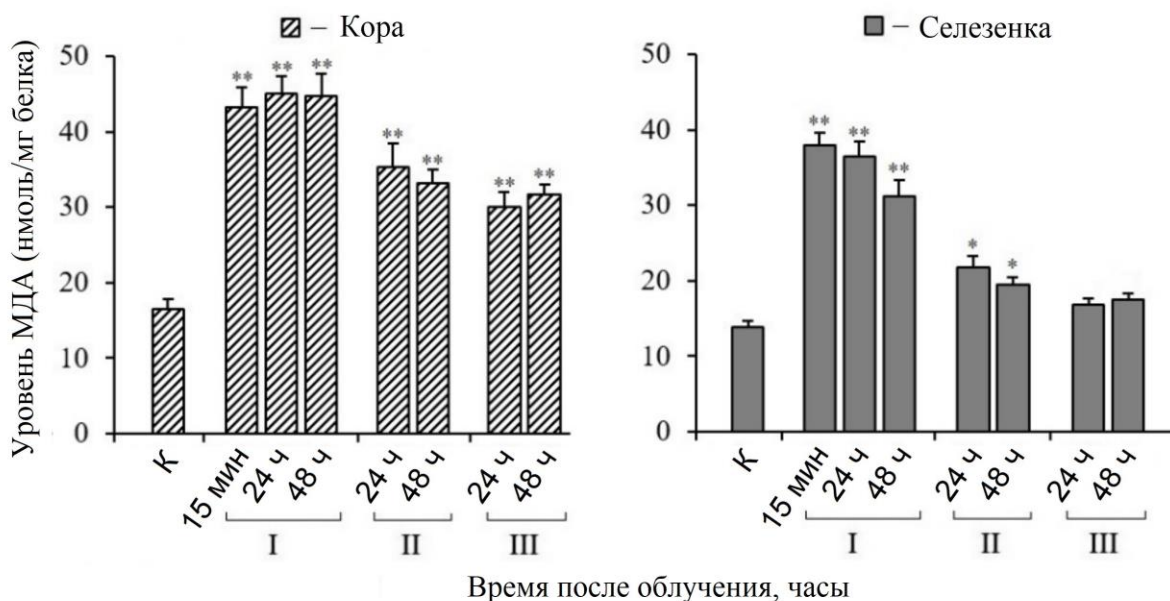


Рисунок 19 – Изменение уровня малонового диальдегида в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения мелатонина; II – введение мелатонина до облучения; III – введение мелатонина после облучения.

Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов.

Статистическая значимость была установлена на уровне

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Эти результаты показывают, что в ткани селезенки через 15 минут и двое суток после облучения наблюдается резкое повышение малонового диальдегида. Введение мышам мелатонина до и после облучения способствует существенному снижению малонового диальдегида в ткани селезенки.

Аналогичные результаты были в анализах малонового диальдегида в ткани коры мозга этих же мышей. Однако результаты анализов в ткани мозга количественно отличаются от данных по анализам ткани селезенки. Прежде всего, в ткани коры мозга уровень малонового диальдегида выше, по сравнению с данными анализов селезенки. Кроме того, введение мелатонина мышам до облучения и после облучения в ткани мозга сохраняется повышенное содержание малонового диальдегида, хотя существенно меньше относительно данных анализов в тканях мышей, которым не вводили мелатонин.

Можно отметить также, что показатели, полученные по анализам малонового диальдегида как в ткани селезенки, так и в ткани коры мозга облученных мышей, которым вводили мелатонин после их облучения, ниже таковых, полученных в тканях мышей, получавших мелатонин до облучения.

Восстановленный глутатион важнейший неферментативный антиоксидант, который играет значительную роль в определении радиочувствительности клеток.

Результаты анализов показывают, что в тканях селезенки и коры мозга мышей после облучения происходит резкое снижение уровня глутатиона (рис. 20).

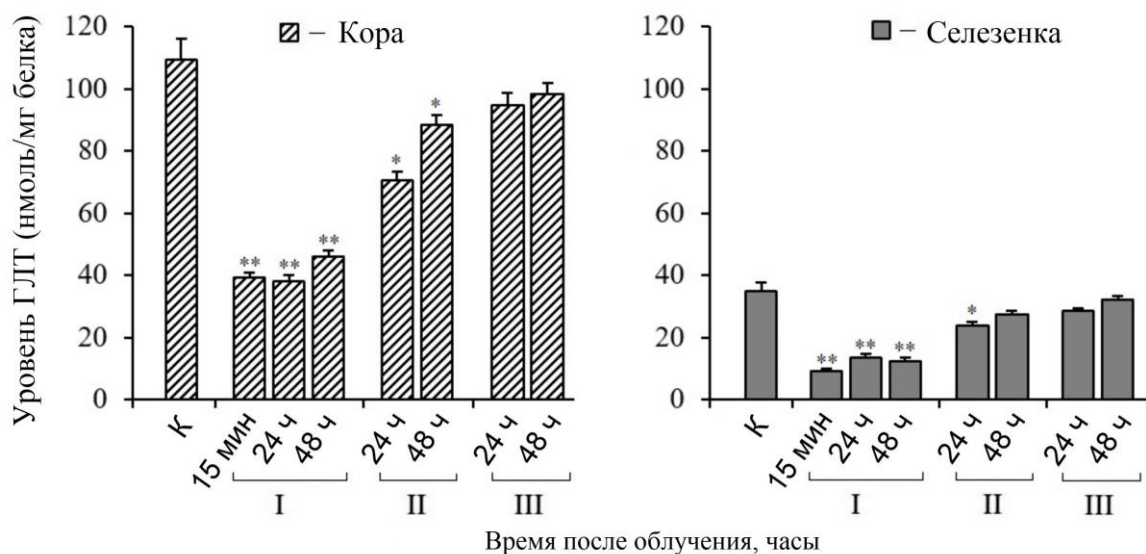


Рисунок 20 – Изменение уровня глутатиона в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения мелатонина; II – введение мелатонина до облучения; III – введение мелатонина после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Эти данные показывают также, что содержание глутатиона в селезенке более чем два раза ниже по сравнению с таковым в ткани коры мозга. Вместе с тем, в обеих тканях в течение пострadiaционного времени (до 48 часов) сохраняется пониженные содержания глутатиона. Только при введении мелатонина мышам до облучения или после облучения, можно было наблюдать активное повышение содержания глутатиона в тканях этих мышей. При этом результаты показывают, что в ткани коры мозга восстановление содержания глутатиона происходит более активно у мышей, которым вводили мелатонин после облучения.

Таким образом, результаты исследования показали, что, хотя ткани селезенки и коры мозга мышей по исходным контрольным величинам анализируемых маркеров различаются, в обеих тканях успешно реализуется противорадиационный потенциал мелатонина.

3.6. Исследование влияния метформина на пострadiaционную выживаемость мышей, образование микроядер в клетках костного мозга и экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс

Наличие циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях животных и человека принято рассматривать как результат постоянно

реализуемой клеточной гибели в их тканях. Различные модуляторы клеточной гибели также позволяют оценивать их действия по изменению содержания вк-ДНК в биологических жидкостях животных и человека. К одним из таких модуляторов относится N, N'-диметилбигуанидин - метформин, который является пероральным гипогликемическим агентом, широко используемым в терапии сахарного диабета 2-типа (Pietrocola and Kroemer 2017). Известно, что метформин является активатором 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) (Aatsinki, et al. 2014). АМФК является полисубъединичным (гетеротримерным) комплексом – главным регулятором клеточного и системного энергетического гомеостаза. Активированная АМФК вызывает каскад внутриклеточных событий, прежде всего, усиление биогенеза митохондрий, аутофагии, и стимулирует производство энергии. Несмотря на то, что молекулярные механизмы действия метформина остаются до конца неизученными, известно, что это лекарство снижает частоту возникновения онкогенеза у людей, и увеличивает продолжительность жизни у грызунов (Anisimov 2015). Метформин также способствует повышению эффективности радиотерапии опухолей при его комбинированном применении (Koritzinsky 2015, Samsuri, et al. 2017). Метформин стимулирует митофагию поврежденных или нефункциональных органелл, обеспечивая восстановление здоровой популяции митохондрий в клетках (Bingol and Sheng 2016, Um and Yun 2017).

Поэтому в данной работе мы исследовали влияния метформина на выживаемость мышей, повреждения ДНК, определяемые по критерию образования микроядер (МЯ) в клетках их костного мозга и на экскрецию вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой крыс, облученных рентгеновскими лучами.

На рисунке 21 представлены результаты определения пострадиационной выживаемости мышей, облученных рентгеновскими лучами в летальной дозе (8 Гр). Эти данные показывают, что в группе мышей, которые получали только питьевую воду, средняя продолжительность жизни составила 6 суток, а максимальное время дожития 11 суток. Аналогичный результат, т.е. отсутствие радиопротекторного эффекта, мы видим по данным пострадиационной гибели мышей группы, получавших метформин за 25 мин до их облучения. Однако, при введении метформина мышам через 15 мин и через 6, 24 часа после их облучения, регистрировалось существенное повышение выживаемости этих животных. Наибольшая выживаемость наблюдалась в группе мышей, получавших метформин через 15 мин после их облучения в летальной дозе. Так, на 11-й день после облучения (8 Гр) наблюдалась 100% смертность в контрольной группе мышей, в то время как в группе мышей, которым вводили метформин после облучения, мы видим, что 78% мышей остаются в живых. 20% мышей выжили в этой группе на 30 день после их облучения. Вместе с тем, как показывают полученные данные, задержка во времени до 6 и 24 часов с введением метформина мышам после их облучения, приводит к снижению защитного эффекта этого препарата (рис. 21).

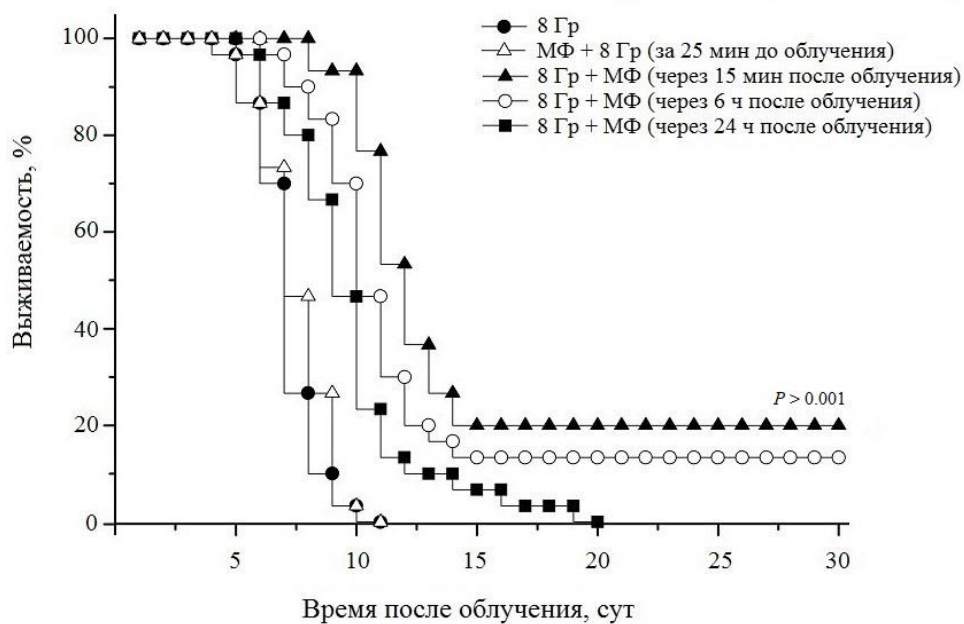


Рисунок 21 – Влияние метформина на выживаемость мышей при введении за 25 мин до и в разное время после воздействия рентгеновского излучения в дозе 8 Гр. Каждая экспериментальная группа состояла из 30 мышей.

Анализ МЯ в клетках костного мозга мышей, которым вводили метформин до и после их облучения рентгеновскими лучами показал сравнимые с их выживаемостью результаты (рис. 22).

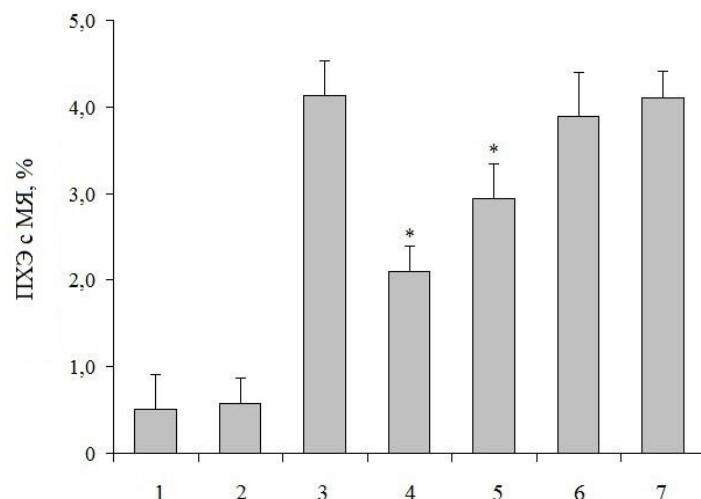


Рисунок 22 – Изменение доли полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами (МЯ) в клетках костного мозга облученных мышей при введении метформина. 1 – контроль; 2 – после введения метформина; 3 – 2 Гр; 4 – 2 Гр + метформин через 15 мин после облучения; 5 – 2 Гр + метформин через 6 часов после облучения; 6 – 2 Гр + метформин через 24 часа после облучения; 7 – метформин за 25 минут до облучения + 2 Гр. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (n=8).
Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$.

Эти данные свидетельствуют о том, что существенно низкий уровень доли полихроматофильных эритроцитов костного мозга (ПХЭ) с МЯ, регистрируется при введении метформина через 15 мин и через 6 часов после облучения животных (в 2 и 1,5 раза, соответственно). При введении метформина мышам за 25 мин до их облучения и через 24 часа после облучения не выявлены достоверные различия частот ПХЭ с МЯ по сравнению с показателями мышей, облученных без введения метформина. Эти данные, как и результаты по определению выживаемости облученных мышей, указывают, что метформин действует как пострадиационный митигаторный эффектор.

На рисунке 23 представлены анализы по выяснению изменения содержания вк-ДНК в моче у необлученных крыс в разные сроки после введения им метформина. Видно, что метформин вызывает увеличение содержания вк-ДНК в моче крыс. Этот повышенный уровень более выражен для вк-мтДНК и сохраняется в течение 12 часов после введения метформина. Статистически достоверное повышение вк-яДНК регистрируется только к первому сроку (6 часам) анализов после введения метформина. Таким образом, введение метформина здоровым (необлученным) крысам способствует повышенной экскреции вк-ДНК с их мочой.

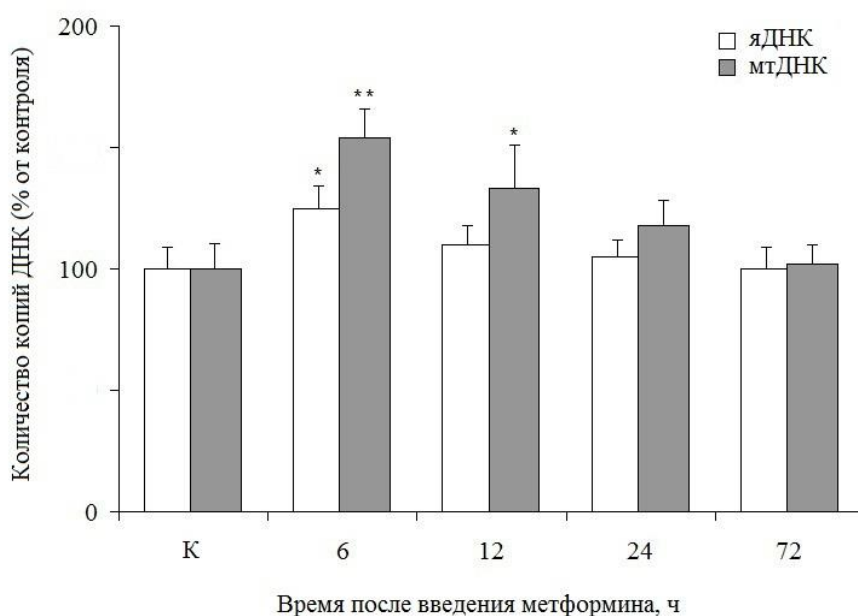


Рисунок 23 – Содержание вк-ДНК выделенной из образцов мочи необлученных крыс, собранных до введения метформина и через 6, 12, 24, 72 часа после введения метформина, (100%, контроль – К, до введения метформина). Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результаты анализов содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс, собранные (через 6, 12, 24, 72 часа) после их облучения в дозе 5 Гр и введения метформина (сразу после облучения), представлены на рисунке 24. Эти данные показывают, что

содержание фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче облученных крыс значительно повышается в зависимости от времени сбора мочи после облучения и введения метформина. Повышенный уровень содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс сохраняется в течение 6, 12, 24 часов после их облучения и введения метформина. Однако к 72 часа после облучения и введения метформина наблюдается снижение содержания вк-ДНК в моче этих крыс до уровня их содержания в образцах мочи контрольных животных. Через 6 и 12 часов после облучения крыс на фоне введения метформина содержание вк-яДНК в моче увеличивается на 290-300%, а содержание вк-мтДНК на 430-530% (относительно контроля – данных, полученных у тех же крыс до облучения и введения метформина). После облучения крыс без введения метформина в моче регистрируется менее выраженное увеличение содержания вк-яДНК 180-200% и вк-мтДНК на 350-400%, соответственно. Больше всего, в этих анализах, выявляется увеличение фрагментов вк-мтДНК в моче облученных крыс, получавших метформин.

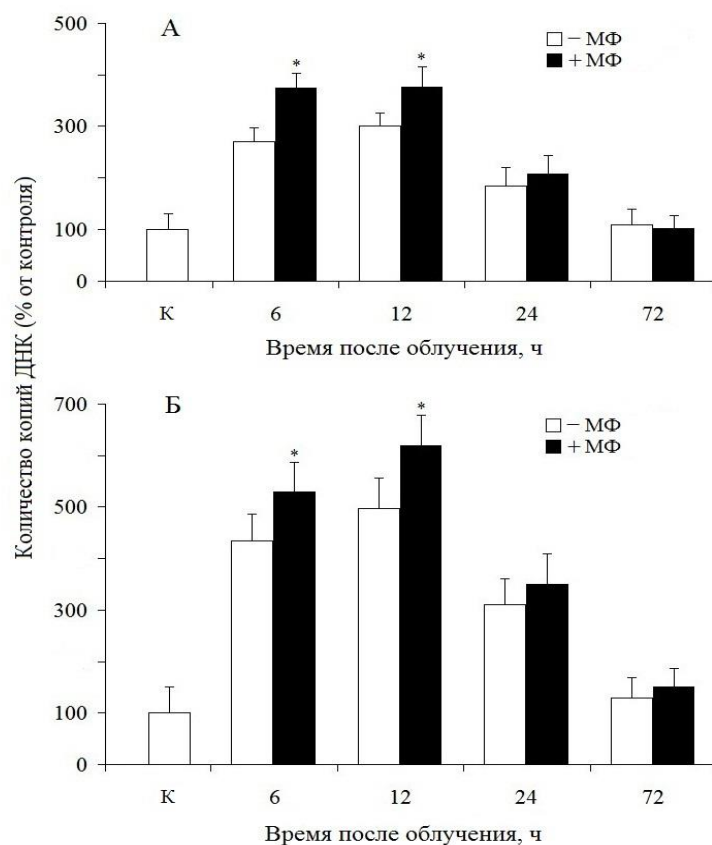


Рисунок 24 – Количество вк-ДНК в моче крыс при введении метформина сразу после облучения в дозе 5 Гр (время сбора мочи через 6, 12, 24, 72 часа после введения метформина). (А) – вк-яДНК; (Б) – вк-мтДНК. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM (n = 8). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$.

На рисунке 25 представлены анализы определения содержания вк-ДНК в моче крыс, получавших метформин через 24 часа после их облучения. Видно, что после

введения метформина животным через 24 часа после их облучения также происходит увеличение в моче содержания фрагментов вк-ДНК.

Однако результаты этих анализов по сравнению с данными, полученными после введения животным метформина сразу после облучения, существенно отличаются.

Максимальные уровни содержания фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче этих крыс определяются также на 6 и 12 часы после введения им метформина. При этом содержание фрагментов вк-яДНК в моче облученных крыс к 6 и 12 часам после введения им метформина остается повышенным на 50 и 35% соответственно, а содержание вк-мтДНК в эти же сроки повышено на 100 и 120% (относительно контроля – данных полученных у тех же крыс до облучения и введения метформина). К этим же срокам, после облучения крыс в группе животных без введения метформина регистрировалось снижение количества фрагментов как вк-яДНК, так и вк-мтДНК, относительно контрольных значений.

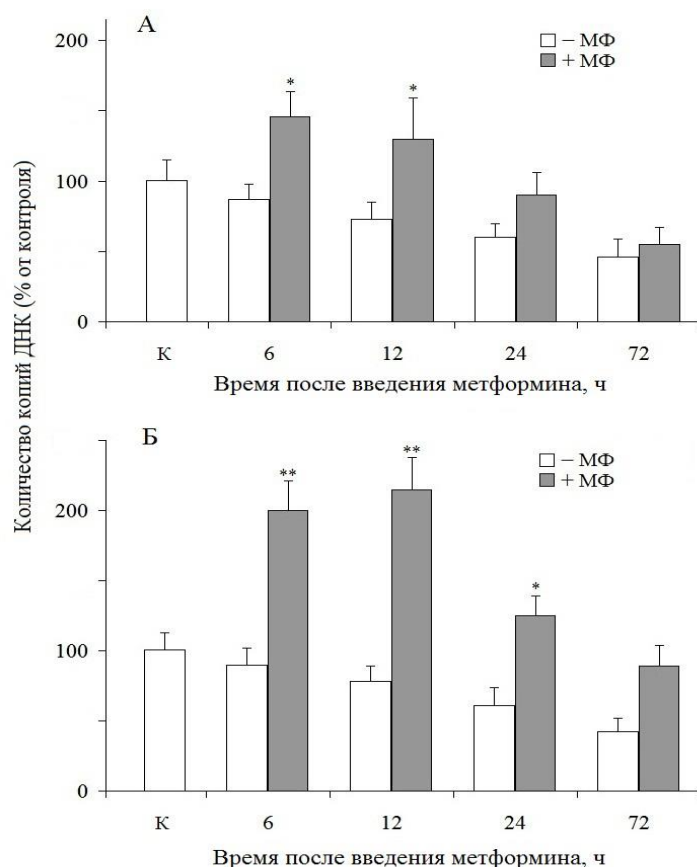


Рисунок 25 – Количество вк-ДНК в моче крыс при введении метформина через 24 часа после облучения в дозе 5 Гр (время сбора мочи через 6, 12, 24, 72 часа после введения метформина). (А) – вк-яДНК; (Б) – вк-мтДНК. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Итак, при введении метформина животным сразу и через 24 часа после облучения происходит усиление экскреции вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой. В первом случае мы наблюдаем более выраженное увеличение фрагментов вк-ДНК. Показано, что в моче облученных крыс, независимо от времени проведения анализа вк-ДНК, после их облучения или времени введения им метформина, количественное содержание вк-мтДНК больше, чем таковое фрагментов вк-яДНК. Повышенный уровень мтДНК явно обусловлен активацией митофагии (Song, et al. 2016, Yamano, et al. 2016). Метформин, возможно, активирует удаление из тканей больше поврежденных клеток, которые могут являться потенциальным для злокачественной трансформации или развития иной патологии (Song, et al. 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате выполнения данного исследования, можно полагать, что мутагенез мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных животных так же, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы ИИ. Обнаружено, что после облучения изучаемых животных ионизирующей радиацией определенное количество фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК, поступающее в кровоток в результате гибели клеток тканей, может преодолеть почечный барьер и поступать в мочу. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше, по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК в моче облученных крыс содержит мутантные копии. Можно полагать, что повышенный уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче облученных животных обусловлен продолжающейся гибелью клеток тканей, и, возможно, селективной элиминацией копий мтДНК с мутациями из клеток тканей. Элиминация мтДНК с мутациями из клеток может происходить в результате митофагии митохондрий, несущих поврежденные и мутантные копии ДНК (He, Klionsky, 2009, Tolkovsky, 2009). Повышенный уровень общей мтДНК и ее мутантных копий в плазме и моче облученных животных происходит не только в результате их элиминации из клеток головного мозга и селезенки, но и из всех тканей облученных особей. Показано, что мелатонин успешно реализует антирадиационный потенциал, восстанавливая митохондриальные функции в облученных клетках, а метформин действует как радиомитигатор, способствуя усиленной экскреции вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой облученных крыс, и обеспечивая им повышение выживаемости и восстановление здоровой популяции митохондрий в облученных клетках.

Важным результатом данного исследования, ориентированным на практическое использование, является обнаружение повышенного уровня общего количества фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК, а также увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме и моче облученных животных. Поскольку мтДНК является более уязвимой мишенью (чем яДНК) для ИИ и других генотоксических агентов, то повышенное содержание вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче животных можно рассматривать как неинвазивный

высокочувствительный биомаркер для оценки радиационного поражения и наличия генотоксического груза, а также при оценке эффективности противолучевых средств.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что активность репарации яДНК, синтез мтДНК и уровень ее мутантных копий, модуляция экспрессии генов, поддерживающих митохондрии, различаются в гиппокампе, коре и мозжечке облученных крыс. Гиппокамп являлся наиболее радиочувствительной областью головного мозга.
2. Впервые установлено возникновение повышенного уровня мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки мышей, подвергнутых радиационному воздействию. Образование мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр).
3. Показано, что уровень мутантных копий мтДНК в тканях облученных мышей снижался на 14-й и 28-й дни после облучения. Снижение мутантных копий мтДНК в ткани селезенки происходило более активно, чем в тканях головного мозга. Содержание общей мтДНК относительно яДНК в тканях облученных мышей было стабильно в течение пострadiационного времени (8-28 дней), хотя и ниже на 25-40% данных контрольной группы.
4. Впервые установлено резкое увеличение уровня вк-мтДНК и ее мутантных копий в плазме крови облученных мышей в течение пострadiационного времени (1-28 дней). Увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей совпадают со снижением их уровня в тканях этих же животных. Результаты свидетельствуют о поступлении в кровоток облученных мышей мутантных копий мтДНК, элиминируемых из тканей этих животных.
5. Впервые показано, что уровень общего количества мтДНК и яДНК в моче облученных крыс зависит как от пострadiационного времени, так и от дозы облучения. Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК в 2-3 раза выше, по сравнению таковым вк-яДНК. Анализ мутантных копий вк-мтДНК показал, что в моче облученных крыс выявляется определенная доля мутантных фрагментов мтДНК. При этом максимальный уровень мутантных копий вк-мтДНК в моче крыс регистрируется на 3-е сутки после облучения.
6. Выявлено повышенное содержание фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче у крыс после введения блеомицина по сравнению с контрольными животными. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК имеет линейную зависимость от дозы химиотерапевтического препарата.
7. Показано, что мелатонин в тканях селезенки и коры головного мозга облученных мышей проявляет выраженные радиозащитные свойства при введении его до и после воздействия радиации. Мелатонин стимулирует пострadiационные восстановления яДНК и мтДНК, снижает уровень мутантных копий мтДНК, а

также восстанавливает митохондриальные функции в тканях селезенки и коры головного мозга после облучения.

8. Установлено, что пероральное введение метформина мышам до облучения не оказывало радиопротекторного эффекта, как по тестам выживаемости, так и по образованию МЯ в ПХЭ костного мозга. Метформин действует как радиомитигатор, способствуя усиленной экскреции вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой облученных крыс, обеспечивая им повышение выживаемости и восстановление здоровой популяции митохондрий в облученных клетках.
9. Повышенные содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в биологических жидкостях (плазма и моча) могут рассматриваться как новые высокочувствительные неинвазивные биомаркеры оценки радиационного ответа организма и других генотоксических агентов, а также оценки эффективности противолучевых средств, в том числе митохондриально-направленного действия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК

1. **Абдуллаев, С.А.** Мутантные копии митохондриальной ДНК в тканях и в плазме мышей, подвергнутых воздействию рентгеновским излучением / **С.А. Абдуллаев**, Е.С. Анищенко, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2010. – Т.50. – №3. – С. 318 – 328. (Scopus, K-2), участие в публикации – 85%.
2. Стрелкова, И.Ю. Доля мутантной внеклеточной митохондриальной ДНК повышается у больных раком легких после радиотерапии / И.Ю. Стрелкова, **С.А. Абдуллаев**, Г.П. Снигирева, В.Г. Безлепкин, А.И. Газиев // Биомедицинская химия. – 2010. – Т.56. – №4. – С. 517 – 525. (Scopus, WoS, RSCI), участие в публикации – 70%.
3. **Абдуллаев, С.А.** Экспериментальное выявление интеграции мтДНК в ядерном геноме, индуцированной ионизирующей радиацией / **С.А. Абдуллаев**, Л.А. Фоменко, Е.А. Кузнецова, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т.53. – №4. – С. 380 – 388. (Scopus, K-2), участие в публикации – 80%.
4. **Abdullaev, S.A.** Experimental detection of mitochondrial DNA insertions in nuclear genome of chicken embryos developed from X-ray irradiated eggs / **S.A. Abdullaev**, A.I. Gaziev // Journal of Genetics and Genome Research. – 2014. 1:008, (ClinMed) участие в публикации – 80%.
5. Gaziev, A.I. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age / A.I. Gaziev, **S. Abdullaev**, A. Podlutsky // Biogerontology. – 2014. – V. 15. – P. 417 – 438. (Scopus, WoS), участие в публикации – 50%.
6. **Abdullaev, S.A.** Cell-free DNA in the urine of rats exposed to ionizing radiation / **S.A. Abdullaev**, G.M. Minkabirova, V.G. Bezlepin, A.I. Gaziev // Radiation and

- Environmental Biophysics. – 2015. – V. 54. – P. 297-304. (Scopus, WoS), участие в публикации – 85%.
7. Gaziev, A. X-rays and metformin cause increased urinary excretion of cell-free nuclear and mitochondrial DNA in aged rats / A. Gaziev, **S. Abdullaev**, G. Minkabirova, K. Kamenskikh // Journal of Circulating Biomarkers. – 2016. – V. 3. P. 1 – 8. (Scopus), участие в публикации – 75%.
 8. Минкабирова, Г.М. Уровень внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче старых крыс резко возрастает после рентгеновского облучения и введения метформина / Г.М. Минкабирова, **С.А. Абдуллаев**, К.А. Каменских, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т.57. – №5. – С. 486 – 494. (Scopus, K-2), участие в публикации – 85%.
 9. **Abdullaev, S.A.** Metformin prolongs survival rate in mice and causes increased urinary excretion of cell-free DNA in X-irradiated rats / **S. Abdullaev**, G. Minkabirova, E. Karmanova, V. Bruskov, A. Gaziev // Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2018. – V. 831. – P. 13 – 18. (Scopus, WoS), участие в публикации – 85%.
 10. Karmanova, E.E. Antioxidant and genoprotective properties of the antidiabetic drug metformin under X-ray irradiation / E.E. Karmanova, **S.A. Abdullaev**, V.E. Ivanov, G.M. Minkabirova, V.I. Bruskov // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V. 487. 012023. (Scopus, WoS), участие в публикации – 50%.
 11. Минкабирова, Г.М. Увеличение содержания внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче крыс после рентгеновского облучения или введения блеомицина / Г.М. Минкабирова, **С.А. Абдуллаев** // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2019. – Т.64. – №5. – P. 5 – 8. (Scopus, K-1), участие в публикации – 90%.
 12. **Абдуллаев, С.А.** Исследование количества копий и гетероплазмии митохондриальной ДНК в различных областях головного мозга крыс после краниального облучения протонов / **С.А. Абдуллаев**, Э.В. Евдокимовский, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2020. – Т.60. – №1. С. 5 – 11. (Scopus, K-2), участие в публикации – 80%.
 13. **Abdullaev, S.A.** A study of mitochondrial DNA copy number and heteroplasmy in different rat brain regions after cranial proton impact / **S.A. Abdullaev**, E.V. Evdokimovskii, A.I. Gaziev // Biology Bulletin. – 2020. – V. 47. – №11. – P. 1489 – 1494. (Scopus, WoS), участие в публикации – 80%.
 14. **Abdullaev, S.** Assessment of nuclear and mitochondrial DNA, expression of mitochondria-related genes in different brain regions in rats after whole-body X-ray irradiation / **S. Abdullaev**, N. Gubina, T. Bulanova, A. Gaziev // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №4. 1196. (Scopus, WoS), участие в публикации – 80%.
 15. **Abdullaev, S.** Increase of mtDNA number and its mutant copies in rat brain after exposure to 150 MeV protons / **S. Abdullaev**, T. Bulanova, G. Timoshenko, A.I.

- Gaziev // Molecular Biology Reports. – 2020. – Т. 47. – Р. 4815 – 4820. (Scopus, WoS), участие в публикации – 80%.
16. **Abdullaev, S.** Radioprotective and radiomitigative effects of melatonin in tissues with different proliferative activity / **S.A. Abdullaev**, S.I. Glukhov, A.I. Gaziev // Antioxidants. – 2021. – Т.10. 1885. (Scopus, WoS), участие в публикации – 80%.
17. **Абдуллаев, С.А.** Мелатонин снижает радиационные повреждения селезенки и увеличивает выживаемость при его введении до и после воздействия на мышей рентгеновского излучения / **С.А. Абдуллаев**, С.И. Глухов, А.И. Газиев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2022. – Т.62. – №5. – С. 523 – 531. (Scopus, K-2), участие в публикации – 80%.
18. Mishukov, A. ONC201-induced mitochondrial dysfunction, senescence-like phenotype and sensitization of cultured BT474 human breast cancer cells to TRAI / A. Mishukov, I. Odinokova, E. Mndlyan, M. Kobyakova, **S. Abdullaev**, V. Zhalimov, X. Glukhova, V. Galat, Y. Galat, A. Senotov, R. Fadeev, A. Artykov, M. Gasparian, M. Solovieva, I. Beletsky, E. Holmuhamedov. // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – № 24. 15551. (Scopus, WoS), 30% участие в публикации.

В сборниках тезисов российских и международных конференций опубликовано 37 работ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
АФК – активные формы кислорода
вк-ДНК – внеклеточная ДНК
вк-яДНК – внеклеточная ядерная ДНК
вк-мтДНК – внеклеточная митохондриальная ДНК
ИИ – ионизирующее излучение
мтДНК – митохондриальная ДНК
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
ПЦР-ПФ – полимеразная цепная реакция на протяженных фрагментах
ТФФ – трифенилфосфоний
ЦПЭ – цепь переноса электронов
ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов
ЭРО – эксцизионная репарация оснований
яДНК – ядерная ДНК
dNTP – дезоксинуклеотид трифосфаты
H₂O₂ – пероксид водорода