

УДК 577.3:591.88:599.323.4:57.084.1:539.1.047

## АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ МЫШЕЙ В РАЗНЫХ ДОЗАХ

© 2022 г. Е. Ю. Москалева<sup>1,\*</sup>, А. В. Родина<sup>1</sup>, Ю. П. Семочкина<sup>1</sup>, О. В. Высоцкая<sup>1</sup><sup>1</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

\*E-mail: moskalevaey@mail.ru

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 22.12.2021 г.

Активные метаболиты кислорода (АМК), образующиеся под действием ионизирующего излучения и факторов воспаления, реагируя с липидами, приводят к образованию токсичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), одним из наиболее активных среди которых является 4-гидрокси-2-ноненаль (4-HNE). Он модифицирует белки клеток по остаткам лизина, гистидина и цистеина и нарушает их функции. Цель работы – анализ количества нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки в клетках, выделенных из мозга мышей через 2 мес. после  $\gamma$ -облучения головы в дозах 2, 8 и 20 Гр, и маркеров нейровоспаления в этот период. Клетки мозга выделяли при центрифугировании через раствор перколла измельченной и обработанной акутазой ткани мозга. Количество нейронов и нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки, а также количество клеток покоящейся и активированной микроглии анализировали с помощью проточной цитометрии, уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$*  в гиппокампе – с помощью ОТ-ПЦР. Показано, что в мозге контрольных мышей  $14.3 \pm 2.3\%$  нейронов содержат 4-HNE-модифицированные белки, через 2 мес. после облучения головы в дозах 8 и 20 Гр их количество возрастало до  $23.1 \pm 2.6\%$  и  $34.8 \pm 4.9\%$  ( $p < 0.05$ ). Обнаружено также относительное повышение активированной микроглии, а в гиппокампе – уровня экспрессии гена *TNF $\alpha$*  после облучения в этих дозах, что свидетельствует о развитии нейровоспаления. Таким образом, нейроны, помимо прямого повреждения при облучении, подвергаются действию АМК и продуктов перекисного окисления липидов, образующихся как в момент облучения, так и в процессе нейровоспаления, развивающегося в отдаленный период после радиационного воздействия. Полученные результаты позволяют рассматривать повышение количества 4-HNE-модифицированных белков в нейронах как маркер окислительного повреждения этих клеток мозга.

**Ключевые слова:** 4-гидрокси-ноненаль, перекисное окисление липидов, нейроны,  $\gamma$ -излучение, нейровоспаление, микроглия, *TNF $\alpha$* , головной мозг, мышь

DOI: 10.31857/S0869803122020059

Действие ионизирующего излучения на живые организмы приводит к повреждению ДНК клеток и образованию активных метаболитов кислорода (АМК). АМК способны непосредственно реагировать с липидами, ДНК и белками, что приводит к повреждению этих молекул и образованию еще более активных и токсичных продуктов, а также обеспечивает развитие длительного окислительного стресса и, как следствие, дальнейшее повреждение клеток и нарушение функций коры головного мозга [1–3].

Развитие перекисного окисления липидов в мозге приводит не только к образованию липидных свободных радикалов, но и к появлению высорореакционных альдегидов, таких как акролеин, малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноне-

наль (4-HNE). Эти альдегиды, в свою очередь, реагируют с клеточными белками с образованием аддуктов, преимущественно по остаткам лизина, гистидина и цистеина, что может нарушать функции этих макромолекул. 4-HNE – основной альдегид, образующийся в результате перекисного окисления  $\omega$ -полиненасыщенных жирных кислот, таких как линолевая и арахидоновая. При окислительном стрессе концентрация 4-HNE в мембранах может составлять от 10 мкмоль/л до 5 ммоль/л [4].

Накопление модифицированных 4-HNE белков в нейронах в результате окислительного стресса, вызванного воспалением, обнаружено также при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, и рассматривает-

ся как важный фактор в прогрессировании и патогенезе таких заболеваний [5–8].

Нарушения когнитивных функций, развивающиеся у части пациентов в отдаленный период после облучения мозга в процессе лучевой терапии опухолей в области головы и шеи, связывают с повреждением нейронов под действием факторов нейровоспаления, в основе которого лежат активация микроглии, последующая активация астроцитов и эндотелиальных клеток и повышенная экспрессия медиаторов воспаления [9]. Развитие пострадиационного нейровоспаления и когнитивных нарушений показано и в экспериментах на животных при умеренных и высоких дозах  $\gamma$ -излучения и особенно при действии излучения с высокой ЛПЭ [10–12]. Нейровоспаление сопровождается образованием АМК и способно приводить к развитию длительного окислительного стресса, образованию реактивных альдегидов и появлению белков, модифицированных 4-HNE. Накопление в нейронах таких белков может быть одним из маркеров окислительного повреждения этих клеток.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение количества нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки в суспензии клеток, выделенных из мозга мышей через 2 мес. после  $\gamma$ -облучения головы в разных дозах. В качестве маркеров нейровоспаления в этот период исследовали относительное количество клеток активированной микроглии в суспензии клеток, выделенных из мозга контрольных и облученных мышей, и уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$*  в гиппокампе мышей – наиболее радиочувствительной области мозга.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

**Лабораторные животные.** В экспериментах использовали 60 мышей самцов линии C57BL/6 в возрасте 7–8 нед массой 18–21 г, полученных из питомника “Столбовая”. При исследовании количества нейронов головного мозга, содержащих модифицированные 4-HNE белки, и количества клеток микроглии проведено две серии экспериментов, в каждой из которых использовано по пять животных в группе (контроль, 2, 8 и 20 Гр), при анализе экспрессии гена *TNF $\alpha$*  в гиппокампе использовано по пять животных в группе. Животных содержали в стандартных условиях вивария, со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ “Курчатовский институт”.

**Облучение.** Однократное воздействие  $\gamma$ -излучения на голову мышей в дозах 2 и 8 Гр и фракционированное облучение головы мышей в суммарной дозе 20 Гр по схеме пять фракций по 4 Гр (три

фракции по 4 Гр с интервалом 1 сут в течение 5 сут, затем через 2 сут еще две фракции с интервалом 1 сут) проводили на установке “ГУТ-200М” (источник –  $^{60}\text{Co}$ , мощность дозы – 2.35 Гр/мин) при комнатной температуре. На время облучения животных помещали в специальные прозрачные пластмассовые фиксаторы для мышей (“Открытая наука”, Россия). Для предотвращения воздействия  $\gamma$ -излучения на другие ткани использовали свинцовую защиту.

**Выделение клеток из головного мозга.** Выделение клеток из мозга контрольных и облученных мышей проводили, как описано ранее [13], в соответствии с методом [14]. Для каждого срока исследования одновременно анализировали мозг контрольных и облученных животных. Транскраниальную перфузию для удаления клеток крови проводили после анестезии мышей с использованием смеси золетила и рометара. Мозг извлекали, удаляли мозжечок и обонятельные доли, помещали в чашку Петри и промывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с сахарозой (20 г/л) и глюкозой (0.9 г/л). Мозг измельчали в холодном ФСБ с добавлением аккутазы, переносили в пробирку и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем добавляли в каждую пробирку по 0.5 мл фетальной бычьей сыворотки (ФБС), помещали в ледяную баню, и гомогенат ткани дважды протирали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм (“SPL Life Sciences”, Республика Корея), а затем 1 раз через сито с диаметром пор 70 мкм и центрифугировали при 4°C 7 мин при 500 g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в 20%-ном изотоническом растворе (10 мл на 1 мозг) перколла (“GE Healthcare”, США). На перколл наслаивали 5 мл раствора Хэнкса (“ПанЭко”, Россия) и центрифугировали 10 мин при 550 g без торможения. Слой миелина, сконцентрированный в интерфазе, и супернатант удаляли, осадок клеток дважды промывали ФСБ. Клетки ресуспендировали в 0.5 мл ФСБ и подсчитывали в камере Горяева с добавлением трипанового синего.

**Фенотипирование клеток головного мозга.** Фенотипирование клеток мозга мыши проводили с помощью окрашивания антителами к соответствующим антигенам. Клетки фиксировали в растворе 2%-ного параформальдегида (ПФА) в ФСБ в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывали ФСБ и пермеабилizировали в ФСБ, содержащем 0.1% Triton X-100 и 1% бычьего сывороточного альбумина (“Sigma Aldrich”, США) в течение 30 мин. Клетки мозга окрашивали антителами к антигену мыши CD11b, конъюгированными с фикоэритрином, и к CD45, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 488. Клетки микроглии идентифицировали как субпопуляцию CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> после двойного окрашивания

ния антителами к CD11b и к CD45 (“BioLegend”, США). Популяция клеток с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> соответствует клеткам активированной микроглии и макрофагам. Разведение антител использовали в соответствии с указаниями фирмы-изготовителя.

При исследовании количества нейронов, содержащих белки, модифицированные 4-HNE, клетки головного мозга фиксировали в ФСБ, содержащем 2% ПФА при комнатной температуре 30 мин. Фиксированные образцы хранили при +4°C. Перед окрашиванием образцы инкубировали в 0.1%-ном растворе Triton X-100, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) для блокировки неспецифического связывания в течение 30 мин при комнатной температуре. Иммуноцитохимическое окрашивание 4-HNE-модифицированных белков и маркера зрелых нейронов NeuN проводили в блокирующем буфере (ФСБ, содержащем 1% БСА) с использованием непрямого кроличьих поликлональных антител (ab46545) к модифицированным 4-HNE белкам (“Abcam”, Великобритания) в разведении 1 : 200, и мышинных моноклональных антител к мышинному белку NeuN (“Merck”, Германия) в разведении 1 : 200 в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее образцы отмывали в ФСБ трижды и окрашивали вторичными антителами: козыми против мышинного иммуноглобулина, мечеными Alexa Fluor 647 (“Biolegend”, США) в разведении 1:1000, и козыми против кроличьего иммуноглобулина, мечеными Alexa Fluor 488 (“Biolegend”, США) в разведении 1:2000 в течение 1 ч при комнатной температуре. После окрашивания образцы трижды отмывали в ФСБ.

Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (“BD Biosciences”, США), оснащенном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, и диодным красным лазером с длиной волны 635 нм. (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии.) В каждом образце анализировали 10000 клеток.

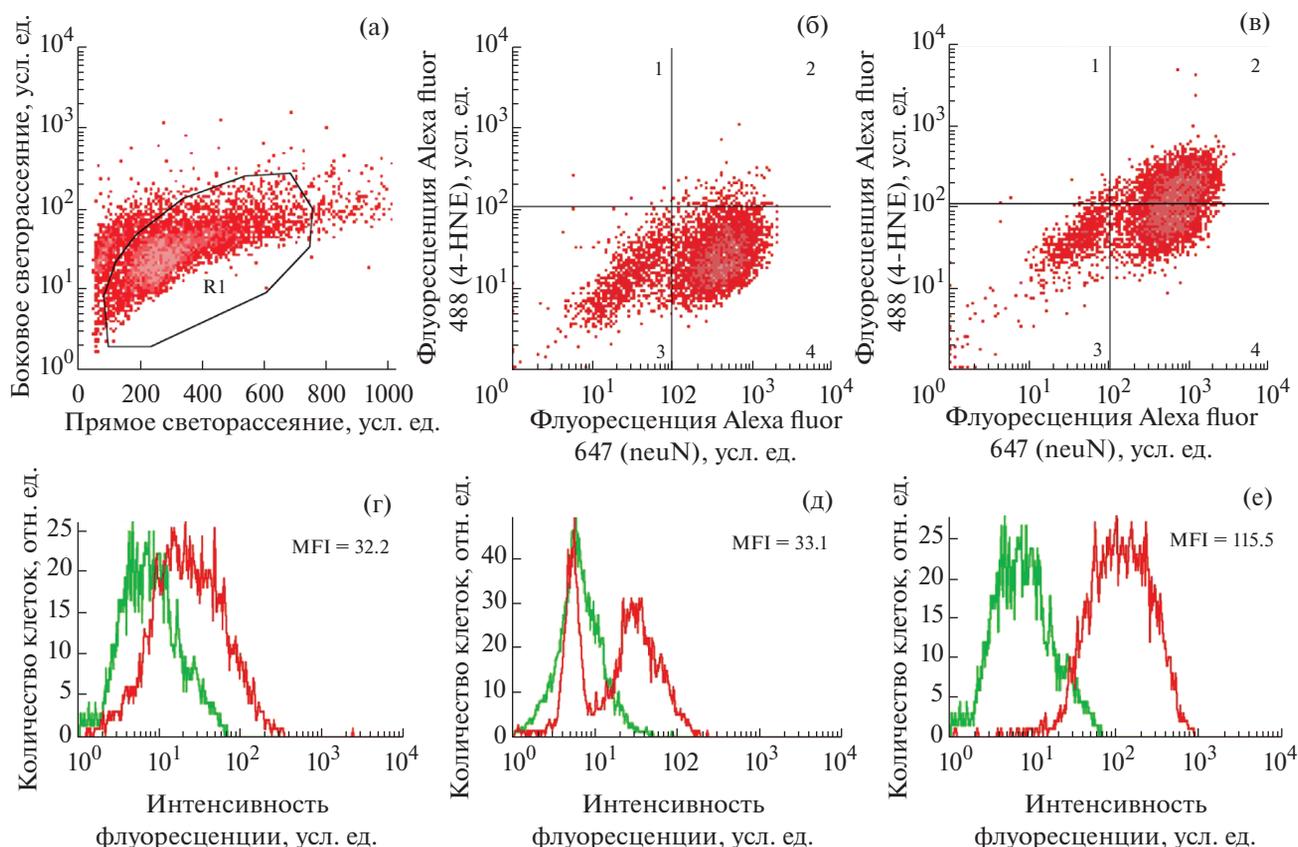
*Анализ экспрессии мРНК гена TNF $\alpha$ .* Анализ экспрессии гена TNF $\alpha$  в гиппокампе мышей проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Через 2 мес. после облучения у контрольных и облученных мышей после проведения перфузии извлекали мозг и отделяли гиппокамп. РНК из гиппокампа выделяли фенол-хлороформным методом, используя реактив ExtractRNA (“Евроген”, Россия) по инструкции производителя. Анализ относительной экспрессии мРНК гена TNF $\alpha$  проводили с помощью ОТ-ПЦР. Обратную транскрипцию (синтез кДНК) проводили в реакционной смеси с конечным объемом 20 мкл, приготовленной на обработанной ДЭПК деионизованной стерильной воде, содержащей 67 ммоль/л Трис-НСI (рН 8.8), 16.6 ммоль/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01%

Tween 20, 4 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л каждого дНТФ, 3.2 мкг смеси гексамерных праймеров со случайной последовательностью, 10 ммоль/л дитиотреитола, 10 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз, 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы M-MLV, 1 мкг суммарной РНК. Смесь инкубировали при 42°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали путем тепловой инактивации обратной транскриптазы, выдерживая смесь при 94°C в течение 10 мин. Экспрессию мРНК гена TNF $\alpha$  определяли с использованием красителя SYBR Green I на амплификаторе CFX96 Touch™ (“Bio-Rad”, США). ПЦР проводили в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) с конечным объемом 25 мкл, в реакцию вносили 2 мкл реакционной смеси после ревертирования, содержащую кДНК и 7.5 пкмоль каждого из пары праймеров: для гена TNF $\alpha$  f5'aaatggcctccctctcatc3', r5'tttgagatccatgccgttg3'; для гена GAPDH f5'cagcctcgtcccgtagaca3', r5'ttccgttgatgacaagcttc3'. Проверку геноспецифичности праймеров осуществляли при помощи программ Oligo Ver.7 и Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi)). Нуклеотидные последовательности генов были взяты из базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Временной и температурный режим ПЦР для анализа экспрессии TNF $\alpha$  и GAPDH: 95°C – 15 с (первый шаг – 5 мин), 54°C (62°C для GAPDH) – 15 с, 72°C – 45 с, 45 циклов ПЦР. Каждый образец кДНК анализировали трижды.

Уровень экспрессии мРНК гена TNF $\alpha$  в гиппокампе измеряли относительно экспрессии конститутивного гена GAPDH и выражали как 2<sup>- $\Delta$ Ct</sup>, где  $\Delta$ Ct = Ct<sub>TNF $\alpha$</sub>  – Ct<sub>GAPDH</sub>. Ct – пороговый уровень флуоресценции, соответствующий номеру цикла ПЦР исследуемого образца, в котором флуоресценция отличается от фонового шума. Анализ проводили с использованием программы Bio-Rad CFX Manager 2.0. Относительный уровень экспрессии гена TNF $\alpha$  в гиппокампе облученных животных рассчитывали по отношению к среднему значению для контрольной группы, который принимали за единицу. Результаты представляли в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение.

*Статистическая обработка результатов.* Статистический анализ осуществляли по методу Стьюдента с использованием t-критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы “Origin”. Результаты, кроме данных по ПЦР, представлены в виде средних значений  $\pm$  ошибка среднего; данные по ПЦР представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ . Для анализа характера зависимости повышения количества нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки, от дозы облучения



**Рис. 1.** Анализ количества нейронов головного мозга, содержащих белки, модифицированные 4-HNE, с помощью проточной цитометрии.

а – прямое/боковое светорассеяние типичного препарата клеток мозга мыши, область R1 соответствует анализируемой популяции.

б и в – dot-plot гистограммы клеток мозга мыши контрольной группы и через 2 мес. после облучения головы в суммарной дозе 20 Гр соответственно, окрашенных антителами к NeuN, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 647, и к модифицированным 4-HNE белкам, конъюгированным с красителем Alexa Fluor 488.

г–е – примеры гистограмм аутофлуоресценции (левый пик) и флуоресценции нейронов, окрашенных антителами к белкам, модифицированным 4-HNE (правый пик), из мозга контрольных (г) и облученных в дозе 8 (д) и 20 Гр (е) мышей. MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

**Fig. 1.** Assessment of the number of brain neurons containing 4-HNE-modified proteins using flow cytometry.

a – forward/side scatter shown for one of the typical samples, R1 region identifies population of interest.

b and c – dot plots for brain cells, isolated from control mice and from mice 2 months after head irradiation at a dose of 20 Gy respectively. Cells were stained with antibodies to NeuN, conjugated with Alexa Fluor 647, and antibodies to 4-HNE modified proteins, conjugated with Alexa Fluor 488.

d–f – examples of the histograms, showing autofluorescence (left peak) and fluorescent signal from the neurons, stained with antibodies to 4-HNE modified proteins (right peak) from the control mice (d) and mice, irradiated at a dose of 8 Gy (e) and 20 Gy (f). MFI – Mean Fluorescence Intensity.

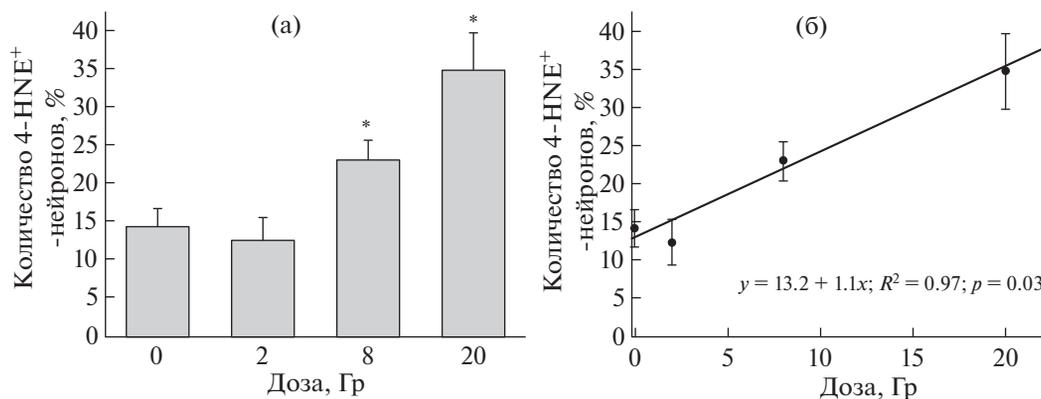
проводили регрессионный анализ также с использованием компьютерной программы “Origin”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки, определяли в суспензии клеток мозга контрольных и облученных мышей через 2 мес. после однократного  $\gamma$ -облучения головы в дозах 2 и 8 Гр и фракционированного облучения головы в дозе 20 Гр.

Алгоритм определения клеток, содержащих 4-HNE-модифицированные белки, с помощью проточной цитометрии показан на рис. 1.

Нейроны идентифицировали как клетки, окрашенные антителами к белку NeuN (расположены в квадратах 2 и 4 на рис. 1, б и в). Нейроны, содержащие 4-HNE-модифицированные белки, определяли как 4-HNE<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>-клетки, расположенные в квадрате 2 dot-plot гистограмм б и в. Относительное количество модифицированных белков в клетках оценивали по величине средней интенсивности флуоресценции (MFI) нейронов,



**Рис. 2.** Количество нейронов головного мозга, содержащих модифицированные 4-HNE белки, через 2 мес. после  $\gamma$ -облучения головы мышей (а) и зависимость их уровня от дозы облучения (б). На рис. б приведено уравнение линии регрессии.

**Fig. 2.** The number of mouse brain neurons, containing 4-HNE modified proteins 2 months after  $\gamma$ -irradiation of the head (a) and its dose dependence and the regression line equation (б).

содержащих 4-HNE-модифицированные белки (рис. 1, гистограммы г–е).

Из представленных данных следует, что через 2 мес. после облучения в дозах 8 и 20 Гр возрастает как количество 4-HNE-модифицированных нейронов (рис. 1, гистограммы б и в), так и количество 4-HNE-модифицированных белков в этих клетках (гистограммы г–е).

Данные количественного анализа полученных результатов представлены на рис. 2 и в табл. 1. Показано, что в мозге контрольных мышей  $14.3 \pm 2.3\%$  нейронов содержат 4-HNE-модифицированные белки, которые образуются в результате модификации эндогенным 4-HNE, возникающим под действием АМК, появляющихся в процессе метаболизма.

Через 2 мес. после облучения головы в дозе 2 Гр увеличения 4-HNE<sup>+</sup>нейронов в мозге облученных мышей по сравнению с контрольными не обнаружено, в то время как количество таких клеток после облучения головы мышей в дозах 8 и 20 Гр статистически значимо возросло с  $14.3 \pm 2.3\%$  в контроле до  $23.1 \pm 2.6$  и  $34.8 \pm 4.9\%$  ( $p < 0.05$ ) соответственно (рис. 2, а). Количество 4-HNE<sup>+</sup>нейронов в выделенной фракции клеток мозга возрастало прямо пропорционально дозе облучения (уравнение линии регрессии  $y = 13.2 + 1.1x$ ;  $R^2 = 0.97$ ;  $p = 0.03$ , рис. 2, б).

Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) 4-HNE<sup>+</sup> нейронов отражает количество модифицированного 4-HNE белка в клетках. В табл. 1 приведены данные об изменении величины MFI 4-HNE<sup>+</sup> нейронов после облучения головы мышей.

Показано достоверное увеличение 4-HNE-модифицированных белков в клетках головного мозга животных через 2 мес. после облучения головы в дозе 20 Гр (табл. 1). Таким образом, при

высоких дозах облучения головы возрастает не только количество нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки, но и количество модифицированного 4-HNE белка в нейронах.

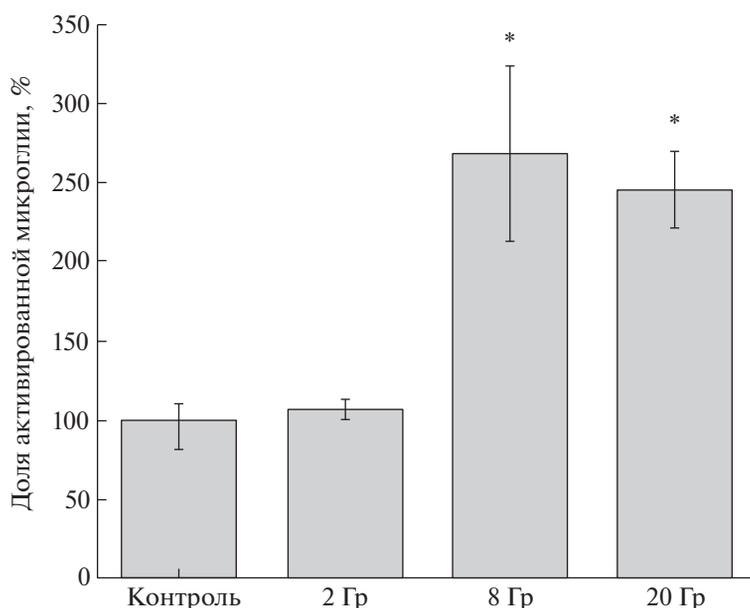
Для оценки развития нейровоспаления в мозге облученных мышей в рассматриваемый период анализировали долю клеток активированной микроглии в выделенной фракции клеток мозга и уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина *TNF $\alpha$*  в гиппокампе. Полученные результаты представлены на рис. 3 и 4.

Долю клеток активированной микроглии с фенотипом CD11<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup> рассчитывали по отношению ко всей микроглии (сумма покоящейся CD11<sup>+</sup>CD45<sup>low</sup> и активированной микроглии CD11<sup>+</sup>CD45<sup>high</sup>) в суспензии выделенных клеток мозга, которые идентифицировали с помощью проточной цитометрии, как описано ранее [13]. Полученные результаты представлены на рис. 3. Доля клеток активированной микроглии в составе выделенной фракции клеток мозга представлена в процентах от контроля.

**Таблица 1.** Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) нейронов, содержащих 4-HNE-модифицированные белки, в суспензии клеток мозга мышей через 2 мес. после облучения головы

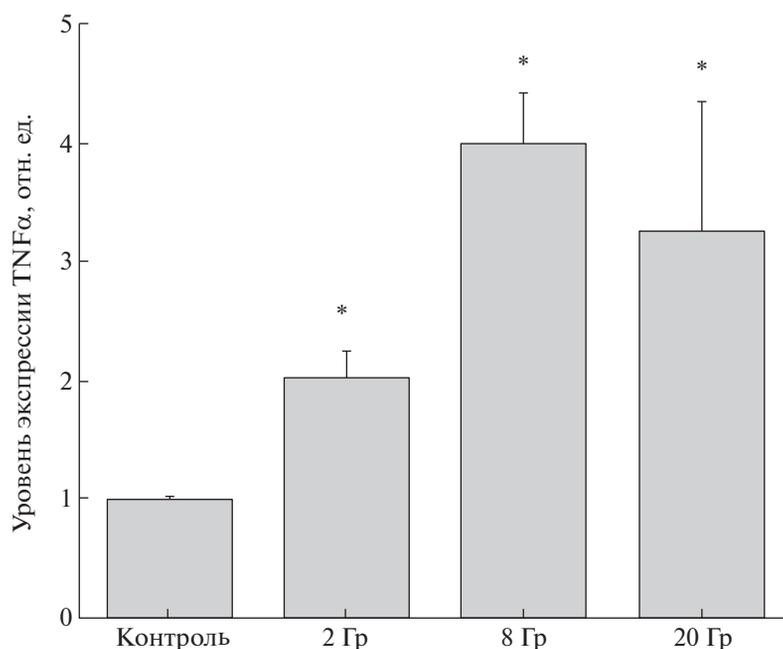
**Table 1.** Median fluorescence intensity (MFI) of neurons derived from the mouse brains 2 months after irradiation of the head and containing 4-HNE modified proteins

Доза, Гр	MFI, усл. ед.
0	16.3 ± 0.6
2	17.4 ± 0.6
8	18.1 ± 1.0
20	27.1 ± 0.6*



**Рис. 3.** Доля клеток активированной микроглии в суспензии клеток, выделенных из головного мозга контрольных мышей и из мозга мышей через 2 мес. после облучения головы в разных дозах.

**Fig. 3.** The proportion of activated microglia in a suspension of cells, isolated from the brains of control mice and mice 2 months after irradiation of the head at different doses.



**Рис. 4.** Уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина *TNFα* в гиппокампе контрольных мышей и мышей через 2 мес. после облучения головы в разных дозах.

**Fig. 4.** The level of cytokine *TNFα* gene expression in the hippocampus of control mice and of mice 2 months after head irradiation at different doses.

Показано, что через 2 мес. после облучения головы мышей в дозе 2 Гр доля активированной микроглии в суспензии клеток, выделенных из мозга, не отличалась от контроля, в то время как

после облучения в дозах 8 и 20 Гр она была достоверно повышена и составляла  $268.3 \pm 55.6\%$  и  $245.0 \pm 25.0\%$  от контроля ( $p < 0.05$ ), что свидетельствует о нейровоспалении в мозге мышей че-

рез 2 мес. после облучения головы в дозах 8 и 20 Гр и его отсутствии в этот период после облучения головы в дозе 2 Гр.

Повышение содержания доли активированной микроглии при разных воздействиях является одним из показателей развития нейровоспаления, при котором в мозге также повышается уровень ряда провоспалительных цитокинов, в частности уровень фактора некроза опухоли  $\alpha$  — *TNF $\alpha$*  — в гиппокампе. На рис. 4 представлены данные, полученные при анализе уровня экспрессии гена *TNF $\alpha$*  в гиппокампах, выделенных у мышей через 2 мес. после облучения головы в дозах 2, 8 и 20 Гр по отношению к уровню, наблюдаемому у контрольных мышей, который был принят за единицу.

Показано, что уровень экспрессии цитокина *TNF $\alpha$*  в гиппокампе мышей, облученных в дозах 2, 8 и 20 Гр через 2 мес., возрастал в 2, 4 и 3 раза соответственно по сравнению с контролем ( $p < 0.05$ ), что свидетельствует о повышении активности этого биохимического маркера нейровоспаления.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве источника нейронов и микроглии в настоящей работе были использованы клетки, выделенные из головного мозга мыши. Полученные препараты, как было показано ранее, содержали нейроны, олигодендроциты, астроциты, клетки покоящейся и активированной микроглии [13], при этом общее количество выделенных клеток составляло 1.5–2.5 млн на 1 мозг. Выделенная фракция представляет лишь небольшую часть от общего количества клеток мозга мыши, но, тем не менее, ее использование позволяет оценить влияние разных воздействий, в том числе и действие  $\gamma$ -облучения головы, на состояние разных типов клеток головного мозга.

При исследовании клеток контрольных мышей и клеток, полученных через 2 мес. после  $\gamma$ -облучения головы в выбранных дозах, нами обнаружено повышение количества нейронов, содержащих белки, модифицированные 4-HNE, после облучения в дозах 8 и 20 Гр, в то время как после облучения головы мышей в дозе 2 Гр количество 4-HNE<sup>+</sup> нейронов не отличалось от контроля. В то же время следует отметить, что в работе [15] при иммуногистохимическом исследовании коры головного мозга через 2 мес. после общего  $\gamma$ -облучения мышей в дозе 2 Гр обнаружено повышение количества 4-HNE<sup>+</sup> нейронов до 35% клеток в поле зрения по сравнению 8% положительных клеток в контроле. Наблюдаемые различия связаны, по-видимому, с особенностями ответа как всего организма, так и клеток мозга на общее и локальное облучение. Так, хорошо известно, что общее облучение мышей в дозе 2 Гр вызывает острую лу-

чевую болезнь с опустошением костного мозга и подавлением кроветворения, которое восстанавливается только после 1 мес. с момента облучения. Глубокая и длительная лейкопения показана и нами при общем облучении мышей в этой дозе [13], в то время как при локальном облучении головы ни при дозе 2 Гр, ни при дозах 8 и 20 Гр не наблюдали снижения количества лейкоцитов в периферической крови облученных мышей [12]. Длительное снижение клеток костного мозга и лейкоцитов периферической крови приводит к глубокому нарушению гомеостаза, в том числе к потере защитных факторов и цитокинов, продуцируемых клетками костного мозга, что может быть причиной более глубокого окислительного повреждения нейронов при общем облучении, чем при локальном облучении головы.

Следует отметить, что около 14% нейронов у необлученных мышей также содержали модифицированные 4-HNE белки (рис. 2, а), что, по-видимому, отражает образование определенного уровня 4-HNE в результате физиологических окислительных процессов в мозге. Действительно, показано, что концентрация 4-HNE в сыворотке крови здоровых добровольцев составляла около 18 мкмоль/л, что определяется эндогенным образованием этого окислительного метаболита. При этом у пациентов с обструктивной болезнью легких в условиях ишемии, вызванной снижением парциального давления кислорода ниже 40 мм рт. ст., концентрация 4-HNE в сыворотке возрастала до 30 и даже до 50 мкмоль/л [16]. Определенный уровень модифицированных 4-HNE белков обнаружен и в нейронах нормального мозга мышей при иммуногистохимическом исследовании, который возрастал при окислительном стрессе, вызванном ишемией [15, 17].

Образование 4-HNE и накопление модифицированных 4-HNE белков, по-видимому, происходит как сразу после облучения, так и в отдаленный период в результате длительного действия факторов воспаления. Вклад каждого из этих процессов в повреждение нейронов в настоящей работе оценен не был, этот вопрос представляет значительный интерес и требует дополнительных исследований. Следует подчеркнуть, что 4-HNE токсичен для клеток [4, 16, 18], поэтому часть клеток с высоким уровнем образования 4-HNE после облучения могла уже погибнуть к 2 мес. после воздействия.

Обнаруженное повышение доли клеток активированной микроглии в выделенных клетках мозга (рис. 3) и повышенный уровень экспрессии гена *TNF $\alpha$*  в гиппокампе мышей, облученных в дозах 8 и 20 Гр, можно рассматривать как признаки нейровоспаления у этих животных спустя 2 мес. после такого воздействия. Нейровоспаление в свою очередь может приводить к повышен-

ной продукции активных метаболитов кислорода, образованию под их действием 4-ННЕ и повреждению нейронов с его участием. Повышение *TNF $\alpha$*  в гиппокампе после облучения мышей в дозе 2 Гр при отсутствии повышения доли активированной микроглии и увеличения модифицированных 4-ННЕ нейронов в выделенных клетках мозга может определяться повышением концентрации свободного 4-ННЕ, который является активатором экспрессии гена *TNF $\alpha$*  [19].

Таким образом, через 2 мес. после облучения головы мышей в дозах 2, 8 и 20 Гр обнаружено дозозависимое повышение количества нейронов, содержащих белки, модифицированные 4-ННЕ. Количество таких нейронов во фракции выделенных клеток мозга возрастало прямо пропорционально дозе облучения. Используемые маркеры нейровоспаления – доля клеток активированной микроглии в выделенной фракции клеток мозга и уровень экспрессии гена цитокина *TNF $\alpha$*  в гиппокампе мышей – также возрастали при увеличении дозы облучения. Это позволяет связывать происхождение модифицированных 4-ННЕ белков в нейронах не только с развитием окислительного стресса непосредственно при облучении мозга, но и с длительным окислительным стрессом в результате действия факторов пострадиационного нейровоспаления.

Полученные результаты позволяют рассматривать повышение количества нейронов, содержащих 4-ННЕ-модифицированные белки в отдаленный период после облучения, как маркер окислительного повреждения этих клеток мозга под действием АМК, образующихся при облучении и вызванном им длительном нейровоспалении.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Noseworthy M.D., Bray T.M.* Effect of oxidative stress on brain damage detected by MRI and in vivo  $^{31}\text{P}$ -NMR // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 24. P. 942–951. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00383-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00383-3)
2. *Manda K., Ueno M., Anzai K.* Memory impairment, oxidative damage and apoptosis induced by space radiation: ameliorative potential of alpha-lipoic acid // *Behav. Brain. Res.* 2008. V. 187. P. 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.09.033>
3. *Poulose S.M., Bielinski D.F., Carrihill-Knoll, Rabin B.M., Shukitt-Hale B.* Exposure to  $^{16}\text{O}$ -particle radiation causes aging-like decrements in rats through increased oxidative stress, inflammation and loss of autophagy // *Radiat. Res.* 2011. V. 176. P. 761–769. <https://doi.org/10.1667/rr2605.1>
4. *Uchida K.* 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress // *Prog. Lipid Res.* 2003. V. 42. № 4. P. 31–43. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(03\)00014-6](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00014-6)
5. *Butterfield D.A., Reed T., Sultana R.* Roles of 3-nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease // *Free Radic. Res.* 2011. V. 45. № 1. P. 59–72. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.520014>
6. *Butterfield D.A., Di Domenico F., Swomley A.M. et al.* Redox proteomics analysis to decipher the neurobiology of Alzheimer-like neurodegeneration: overlaps in Down's syndrome and Alzheimer's disease brain // *Biochem J.* 2014. V. 463. № 2. P. 177–189. <https://doi.org/10.1042/BJ20140772>
7. *Petrovic S., Arsic A., Ristic-Medic D. et al.* Lipid Peroxidation and Antioxidant Supplementation in Neurodegenerative Diseases: A Review of Human Studies // *Antioxidants.* 2020. V. 9. № 11. P. 1128. <https://doi.org/10.3390/antiox9111128>
8. *Zarkovic K., Jakovcivica A., Zarkovic N.* Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 111. P. 110–126. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.009>
9. *Greene-Schloesser D., Robbins M., Peiffer A. et al.* Radiation-induced brain injury: A review // *Front. Oncol.* 2012. V. 19. № 2. P. 73. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00073>
10. *Raber J.* Unintended effects of cranial irradiation on cognitive function // *Toxicol. Pathol.* 2010. V. 38. № 1. P. 198–202. <https://doi.org/10.1177/0192623309352003>
11. *Lumniczky K., Szatmári T., Sáfrány G.* Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 517. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00517>
12. *Журник А.С., Смирнова О.Д., Семочкина Ю.П. и др.* Нарушение когнитивных функций и развитие нейровоспаления в отдаленный период после однократного  $\gamma$ -облучения головы мышей // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2021. Т. 61. № 1. С. 32–43. [*Zhirnik A.S., Smirnova O.D., Semochkina Yu.P. et al.* Cognitive Impairment and Induction of Neuroinflammation in the Late Period after Single Whole Brain  $\gamma$ -Irradiation of Mice // *Radiacionnaya biologiya. Radiojekologiya.* 2021. V. 61. № 1. P. 32–43 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.31857/S0869803121010112>
13. *Родина А.В., Семочкина Ю.П., Ратушняк М.Г. и др.* Анализ ориентировочно-исследовательской активности и уровня микроглии у мышей, подвергшихся воздействию  $\gamma$ -излучения в сублетальных дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2019. Т. 59. № 6. С. 575–584. [*Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Ratushnyak M.G. et al.* Analyzis of Exploratory Rearing and Microglia Level after  $\gamma$ -Irradiation of Mice at Sublethal Doses // *Radiacionnaya biologiya. Radiojekologiya.* 2019. V. 59. V. 6. P. 575–584 (In Russ.)] <https://doi.org/10.1134/S0869803119060092>
14. *Legroux L., Pittet C.L., Beauseigle D. et al.* An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry // *J. Neurosci. Methods.* 2015. V. 247. P. 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2015.03.021>
15. *Suman S., Rodriguez O.C., Winters T.A. et al.* Therapeutic and space radiation exposure of mouse brain causes impaired DNA repair response and premature senescence by chronic oxidant production // *Aging (Albany NY).* 2013. V. 5. № 8. P. 607–622. <https://doi.org/10.18632/aging.100587>

16. Liu J., Huang J., Liu H. et al. Elevated serum 4HNE plus decreased serum thioredoxin: Unique feature and implications for acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease // PLoS One. 2021. V. 16. № 1. P. e0245810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245810>
17. Lu L., Guo L., Gauba E. et al. Transient Cerebral Ischemia Promotes Brain Mitochondrial Dysfunction and Exacerbates Cognitive Impairments in Young 5xFAD Mice // PLoS One. 2015. V. 10. № 12. P. e0144068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144068>
18. Дубинина Е.Е., Дадали В.А. 4-гидрокси-транс-2-ноненаль в функциональной активности клеток // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1189–1212. [Dubinina E.E., Dadali V.A. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions // Biochemistry (Mosc). 2010. V. 75. № 9. P. 1069–1087. (In Russ.)] <https://doi.org/10.1134/s0006297910090014>
19. Zhang X.M., Guo L., Huang X. et al. 4-Hydroxynonenal Regulates *TNF- $\alpha$*  Gene Transcription Indirectly via ETS1 and microRNA-29b in Human Adipocytes Induced From Adipose Tissue-Derived Stromal Cells // Anat. Rec. (Hoboken). 2016. V. 299. № 8. P. 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/ar.23371>

## Analysis of Markers of Oxidative Damage of Neurons and Neuroinflammation Late after $\gamma$ -Irradiation of the Mice Head at Different Doses

E. Yu. Moskaleva<sup>a, #</sup>, A. V. Rodina<sup>a</sup>, Yu. P. Semochkina<sup>a</sup>, and O. V. Vysotskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

<sup>#</sup> E-mail: moskalevaey@mail.ru

Reactive oxygen species (ROS), formed under the action of ionizing radiation and of inflammation factors, react with lipids, lead to the formation of toxic metabolites, one of the most active among which is 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). The aim of this work is to study the number of neurons containing 4-HNE-modified proteins 2 months after  $\gamma$ -irradiation of the head at doses of 2, 8, and 20 Gy, and to determine the development of neuroinflammation at this period. Mouse brain cells were isolated by centrifugation through Percoll solution after brain tissue treatment with accutase. The number of neurons and neurons containing 4-HNE-modified proteins, as well as the number of cells of resting and activated microglia were analyzed using flow cytometry, the level of the proinflammatory cytokine *TNF $\alpha$*  gene expression in the hippocampus was analyzed using RT-PCR. It was shown that in the brains of control mice,  $14.3 \pm 2.3\%$  of neurons contain 4-HNE-modified proteins. Two months after irradiation of the head of mice at doses of 8 and 20 Gy the number of 4-HNE<sup>+</sup> neurons increased to  $23.1 \pm 2.6\%$  and  $34.8 \pm 4.9\%$  ( $p < 0.05$ ). An increase in the proportion of activated microglia in isolated brain cells and in the level of *TNF $\alpha$*  gene expression in the hippocampus at this period indicates the development of neuroinflammation. Thus, in addition to direct damage during irradiation, neurons are exposed to ROS and toxic metabolites of lipid peroxidation, which are formed both at the time of irradiation and during the neuroinflammation, which develops late after radiation exposure.

**Keywords:** 4-hydroxy-nonenal, lipid peroxidation, neurons, gamma radiation, local irradiation, neuroinflammation, microglia, TNF $\alpha$ , brain, mouse