

ДЕЛЕЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У ПОТОМКОВ САМОК МЫШЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2019 г. М.Г. Ломаева, В.Н. Антипова, В.Г. Безлепкин, А.И. Газиев

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: lommg1@gmail.com

Поступила в редакцию 08.04.2019 г.

После доработки 08.04.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2019 г.

Проведена оценка влияния рентгеновского излучения на митохондриальный геном потомков самок мышей, облученных в прекоцептивном периоде в дозах 0,5 и 2 Гр. Последствия воздействия рентгеновского излучения оценивали по доле потомков, имеющих делецию мтДНК размером 4974 п.о. Результаты проведенного исследования показали, что облучение самок мышей в выбранных дозах не приводит к увеличению доли их потомков, имеющих делецию мтДНК в клетках тканей головного мозга, селезенки и периферической крови.

Ключевые слова: мыши, рентгеновское излучение, потомки F1, делеция мтДНК.

DOI: 10.1134/S0006302919040045

Исследования молекулярных, генетических последствий радиационного воздействия остаются достаточно актуальной проблемой. Развитие этих исследований востребовано в связи с широким использованием ионизирующих излучений в терапии опухолей и в других областях медицины. Кроме того, люди могут подвергаться воздействию ионизирующих излучений в процессе профессиональной деятельности, в результате ядерных аварий и при возможном радиационном терроризме.

Ранее нами проводились исследования влияния прекоцептивного облучения либо самцов, либо самок мышей на ядерный геном их потомства. Нам удалось обнаружить повышенный уровень нестабильности ядерного генома в тканях (периферической крови, селезенке, кончике хвоста и головном мозге) потомства самок не только в сравнении с контролем, но и в сравнении с потомством облученных самцов [1,2]. По сравнению с другими клетками мтДНК в ооцитах — крупная мишень для радиационного воздействия, поскольку в ооците млекопитающих митохондрии занимают значительный объем, включая от 150 тысяч до более 1 млн копий митохондриальной ДНК (мтДНК), по одной-две копии на од-

ну органеллу [3]. Таким образом, можно полагать, что одной из возможных причин более выраженной нестабильности митохондриального генома потомства облученных самок, по сравнению с потомками облученных самцов, могут быть повреждения в мтДНК ооцитов, которые у млекопитающих наследуются по материнской линии [4].

Одним из распространенных изменений в митохондриальном геноме являются делеции — структурные перестройки, приводящие к утрате части генов [5]. Превышение порогового уровня молекул мтДНК с делециями приводит к дефициту белков цепи переноса электронов, повышенной генерации активных форм кислорода и азота и окислительному стрессу, митохондриальной дисфункции [6,7]. Наличие делеции 4977 п.о., встречающейся в тканях человека наиболее часто, рассматривают как индикатор повреждения мтДНК соматических клеток [8]. После воздействия ионизирующих излучений в клетках также происходит формирование делеций мтДНК [9–11]. Поскольку воздействие генотоксических факторов на ооциты может вызвать наследуемую нестабильность не только ядерного, но и митохондриального генома, мы попытались оценить влияние ионизирующей радиации на митохондриальный геном соматических клеток (клеток

Сокращения: мтДНК — митохондриальная ДНК.

Таблица 1. Характеристика групп мышей-потомков, рожденных до и после облучения самок-родителей

Прекоцептивные дозы внешнего рентгеновского облучения самок-родителей, Гр	Количество потомков, <i>n</i>	Среднее количество потомков в помете, шт.*	Пол потомков	
			самка, %	самец, %
0	29	9.7 ± 0.3	59	41
0.5	34	11.3 ± 1.75	56	44
0	37	7.4 ± 0.35	49	51
2	40	8 ± 1.38	43	57

Примечание. * Среднее арифметическое значение на группу и стандартная ошибка среднего.

головного мозга, селезенки и периферической крови) у потомков (F_1) самок мышей, подвергнутых воздействию острого рентгеновского излучения в дозах 0,5 и 2 Гр. Последствия воздействия ионизирующей радиации оценивали по доле потомков этих самок, имеющих делецию мтДНК размером 4974 п.о. в клетках тканей головного мозга, селезенки и периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте были использованы двухмесячные мыши линии BALB/c из питомника экспериментальных животных филиала Института биоорганической химии РАН (Пушино). Сравнивали два потомства (F_1), рожденные от одних и тех же родительских пар животных (поколения F_0). Первое потомство получали до облучения самок, второе – после воздействия на самок радиации. Первое потомство, рожденное необлученными самками, рассматривали в качестве «контрольного». Через 40 суток после рождения первого потомства самок подвергали воздействию рентгеновского излучения в дозах 0,5, 1 и 2 Гр при мощности экспозиционной дозы 0,1 Гр/с на установке РУМ-13 (напряжение 200 кВ, сила тока 8 мА, фильтры 1,0 мм Cu и 1,0 мм Al, фокусное расстояние 74 см) в ЦКП «Источники излучений» ИБК РАН. Затем самки спаривались с теми же самцами, от которых было получено первое потомство [2].

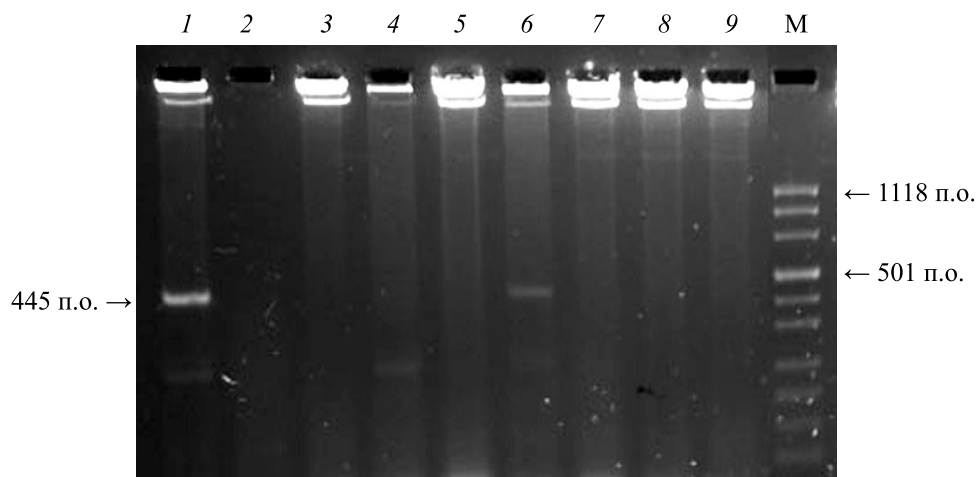
Потомство, рожденное до и после облучения родителей, по достижении четырехнедельного возраста забивали путем дислокации шейных позвонков и собирали образцы тканей (цельную

кровь, селезенку, кончик хвоста и головной мозг). Все манипуляции с животными проводили согласно рекомендациям Комиссии по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН. Выделение ДНК проводили методом фенольной депротенинизации после обработки тканевых лизатов протеиназой К и РНКазой [2].

Для проведения данного исследования использовали образцы общей ДНК, полученные из периферической крови, головного мозга и селезенки потомков самок мышей, которые были облучены в дозах 0,5 и 2 Гр и дали по два помета. Краткая характеристика групп животных в выведенных семьях представлена в табл. 1.

Полимеразная цепная реакция. Фрагмент митохондриального генома амплифицировали с комбинацией праймеров PL69 (5'-AATTACAG-GCTTCCGACACAA-3') и PL70 (5'-GGAGATTG-GTTGATGTATGAG-3') [12]. Реакцию амплификации выполняли на приборе «Терцик» («ДНК Технология», Россия), она состояла из 35 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация при 94°C в течение 40 с, отжиг при 50°C – 20 с и элонгация при 72°C – 1 мин. Предварительная денатурация при 94°C – 4 мин, завершающий синтез – 10 мин при 72°C. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2%-м агарозном геле, содержащем бромистый этидий, и документировали с помощью геле-документирующей системы DocPrint (Vilber Lourmat Systems, Франция).

Статистическая обработка результатов. Для сравнения долей потомков с делециями мтДНК в группах использовали двухсторонний точный критерий Фишера (F) при уровне значимости



Пример электрофореграммы продуктов ПЦР при определении делеции мтДНК 4974 п.о.: дорожки 1 и 6 – мтДНК с делецией; дорожки 2–5 и 7–9 – мтДНК без делеции; М – маркер молекулярного веса ДНК (pUC Mix Marker 8, Fermentas, США).

$p \leq 0,05$. Его расчет выполнен в программе IBM SPSS Statistic 19 (IBM Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были определены доли мышей-потомков, имеющих делецию мтДНК, в группах мышей, рожденных до и после облучения самок-

родителей. Образцы общей ДНК, полученные из периферической крови, головного мозга и селезенки потомков, были исследованы на наличие делеции мтДНК размером 4974 п.о. Для выявления делеции был использован метод ПЦР протяженных фрагментов и комбинация праймеров PL69 и PL70 [12]. Если в исследуемом образце

Таблица 2. Доля мышей-потомков, имеющих делецию 4974 п.о., рожденных до и после облучения самок-родителей

Прекоцептивные дозы внешнего рентгеновского облучения самок-родителей, Гр	Доля потомков с делецией в тканях, %		
	Мозг	Селезенка	Кровь
0	20.7	20.7	20.7
0.5	17.6	11.8	23.3
	$F_{0-0.5}^*$		
	$p = 1.000$	$p = 0.492$	$p = 1.000$
0	24.3	16.2	8.1
2	22.5	35	17.5
	F_{0-2}		
	$p = 1.000$	$p = 0.073$	$p = 0.314$

Примечание. * F_{n-m} – двухсторонний точный критерий Фишера; p – достигнутый уровень значимости по критерию F .

Таблица 3. Доля мышей-потомков разного пола, имеющих делецию 4974 п.о., рожденных до и после облучения самок-родителей

Прекоцептивные дозы внешнего рентгеновского облучения самок-родителей, Гр	Доля потомков – самок и самцов с делецией в тканях, %					
	мозг		селезенка		кровь	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
0	50	50	66.7	33.3	50	50
	F_{0-0}^*					
	$p = 0.669$		$p = 1.000$		$p = 0.669$	
0.5	50	50	50	50	37.5	62.5
	$F_{0.5-0.5}$					
	$p = 0.669$		$p = 0.669$		$p = 0.417$	
0	55.6	44.4	66.7	33.3	33.3	66.7
	F_{0-0}					
	$p = 0.714$		$p = 0.405$		$p = 1.000$	
2	33.3	66.7	28.6	71.4	42.9	57.1
	F_{2-2}					
	$p = 0.707$		$p = 0.315$		$p = 1.000$	

Примечание. * F_{n-m} – двухсторонний точный критерий Фишера; p – достигнутый уровень значимости по критерию F .

ДНК содержались молекулы мтДНК с данной делецией, то синтезировался фрагмент размером 445 п.о., определяемый электрофоретически (рисунки).

Только в группе животных, рожденных самками после облучения в дозе 2 Гр, наблюдается тенденция к увеличению доли потомков с делециями в клетках ткани селезенки ($p = 0,073$). Различия в долях потомков с делециями в этой ткани после облучения самок-родителей в дозе 0,5 Гр по сравнению с контрольным потомством статистически не значимы. Не выявлено статистически значимых изменений в долях потомков с делециями в тканях мозга и крови до и после облучения самок-родителей в дозах 0,5 и 2 Гр (табл. 2).

Облучение самок в дозе 0,5 Гр не привело к возрастанию доли их потомков с делециями, возможно, потому, что эта доза была недостаточна для индукции нестабильности митохондриально-

го генома. Причиной отсутствия изменений в доле потомков с делециями после облучения самок-родителей в дозе 2 Гр может быть элиминация ооцитов, содержащих значительное количество поврежденных копий мтДНК [13]. Возможно, в поврежденных клетках дисфункциональные митохондрии, содержащие мтДНК с делециями, удаляются по механизму митофагии [14]. Дефицит АТФ вследствие повреждений в мтДНК мог оказаться критическим для выживания и развития эмбрионов [15]. Остаются жизнеспособными те, кто имеет мало мутантных копий мтДНК. Защитой от материнской передачи мтДНК с мутациями от одного поколения другому также может быть эффект «узкого места» (genetic bottleneck). Возможная роль механизмов действия митохондриального «генетического узкого места» обсуждается в литературе [16].

Делеция мтДНК размером 4974 п.о. была выявлена во всех исследованных нами тканях. У мышей, как и у людей, делеции мтДНК встречаются в разных тканях, и их количество увеличивается по мере старения организма [12,17–19]. Делеции мтДНК у млекопитающих накапливаются в постмитотических тканях, таких как головной мозг, печень, сердце и скелетные мышцы, характеризующихся более низкой скоростью деления клеток и более высоким уровнем энергетического обмена [20]. Предполагается также, что «митотически активные» ткани обладают способностью элиминировать клетки с мутациями мтДНК в течение жизни, тогда как в «постмитотических» тканях такие клетки не удаляются и могут вместо этого способствовать накоплению мутантных копий мтДНК [21].

Ранее нами было показано различие проявления нестабильности ядерного генома у потомков разного пола, рожденных от самок мышей, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений [22]. У самок-потомков, рожденных самками, облученными в дозе 2 Гр, уровень полиморфизма яДНК был выше по сравнению с самцами-потомками. Поэтому представлялось интересным оценить влияние ионизирующей радиации на митохондриальный геном потомков разного пола, рожденных от облученных самок-родителей.

Как видно из данных, представленных в табл. 3, ни в контрольных, ни в облученных группах не было выявлено статистически значимых различий между долями потомков-самок и потомков-самцов с делецией мтДНК.

Отсутствие ассоциации делеций мтДНК с полом показано и при исследовании делеций в тканях людей [23,24].

Таким образом, результаты исследования, выполненного с использованием такой адекватной модели, как сравнение потомства от одной и той же родительской пары до и после облучения в условиях строгого дозиметрического контроля, показали, что воздействие рентгеновского излучения в дозах 0,5 и 2 Гр на самок-мышей линии BALB/c не приводит к увеличению доли их потомков с делецией мтДНК 4974 п.о. в клетках тканей головного мозга, селезенки и периферической крови.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-48274).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. V. Vasil'eva, V. G. Bezlepkin, M. G. Lomaeva, et al., *Mutat. Res.* **485** (2), 133 (2001).
2. M. G. Lomaeva, G. V. Vasil'eva, L. A. Fomenko, et al., *Rus. J. Genetics* **47** (10), 1221 (2011).
3. M. V. Cannon, K. Takeda, and C. A. Pinkert, *Reprod. Med. Biol.* **10**, 251 (2011).
4. G. S. Shadel and D. A. Clayton, *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 409 (1997).
5. J. M. Cooper, V. M. Mann, and A. H. Schapira, *J. NeuroSci.* **113** (1), 91 (1992).
6. А. И. Газиев., *Радиац. биол. радиоэкол.* **53** (2), 117 (2013).
7. W. W. Kam and R. B. Banati, *Free Radic. Biol. Medic.* **65**, 607 (2013).
8. A. Quigley, K. Reardon, R. Kapsa, et al., *J. Clin. Neuromusc. Dis.* **3** (2), 77 (2001).
9. N. Kubota, J. Hayashi, T. Inada, et al., *Radiat. Res.* **148** (4), 395 (1997).
10. S. Prithivirajsingh, M. D. Story, S. A. Bergh, et al., *FEBS Lett.* **571** (1–3), 227 (2004).
11. V. N. Antipova, L. V. Malakhova, and V. G. Bezlepkin, *Biofizika* **56** (3), 439 (2011).
12. S. M. Tanhauser and P. J. Laipis, *J. Biol. Chem.* **270** (42), 24769 (1995).
13. W. Fan, K. G. Waymire, N. Narula, et al., *Science* **319** (5865), 958 (2008).
14. A. L. Boudoures, J. Saben, A. Drury, et al., *Dev. Biol.* **426** (1), 126 (2017).
15. S. Chappel, *Obstet. Gynecol. Int.* AD 183024 (2013).
16. H. Zhang, S. P. Burr, and P. F. Chinnery, *Essays Biochem.* **62** (3), 225 (2018).
17. A. F. Phillips, A. R. Millet, M. Tigano, et al., *Mol. Cell.* **65** (3), 527 (2017).
18. N. Kazachkova, A. Ramos, C. Santos, et al., *Aging Dis.* **4** (6), 337 (2013).
19. P. M. Eimon, S. S. Chung, C. M. Lee, et al., *Dev. Genet.* **18** (2), 107 (1996).
20. A. Trifunovic, A. Wredenberg, M. Falkenberg, et al., *Nature* **429** (6990), 417 (2004).
21. K. Krjutškov, M. Koltšina, K. Grand, et al., *Curr. Genet.* **60** (1), 11 (2014).
22. М. Г. Ломаева, Л. А. Фоменко, Г. В. Васильева и др., *Радиац. биол. радиоэкол.* **56** (2), 149 (2016).
23. S. Ye. Zhang, A. A. Sayer, et al., *Biochem. Soc. Trans.* **31** (2), 444 (2003).
24. X. T. Zhao, J. B. Feng, Y. W. Li, et al., *Biomed. Environ. Sci.* **25** (5), 533 (2012).

Mitochondrial DNA Deletion in Offsprings from Female Mice Exposed to X-Radiation**M.G. Lomaeva, V.N. Antipova, V.G. Bezlepkin, and A.I. Gaziev***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region 142290 Russia*

Effects of X-irradiation on the mitochondrial genome of the offsprings from female mice irradiated in the preconceptional period with doses of 0.5 and 2 Gy were estimated. Radiation effects were evaluated by the number of offspring with the mtDNA 4974-bp deletion. The results of the study showed that irradiation of female mice with abovementioned doses led to no increase in the number of offspring with the mtDNA deletion in cells of the brain and spleen tissues and peripheral blood.

Keywords: mice, X-radiation, F1 offspring, mtDNA deletion