

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С КОГНИТИВНЫМ СНИЖЕНИЕМ В СРАВНЕНИИ СО ЗДОРОВЫМИ ДОБРОВОЛЬЦАМИ

Ю.П. Семочкина¹, Е.Ю. Москалева^{1}, И.К. Малашенкова¹, С.А. Крынский¹,
Н.А. Хайлов¹, Д.П. Огурцов¹, Е.В. Пономарева², С.И. Гаврилова²*

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1; *эл. почта: Moskaeva_EY@nrcki.ru

²Научный центр психического здоровья, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34

Изучены индивидуальные различия в эффективности репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК, оцениваемых по уровню остаточных фокусов γ H2AX через 24 ч после γ -облучения в дозе 2 Гр в лимфоцитах здоровых добровольцев и пациентов с мягким когнитивным снижением амнестического типа (МКСА) и болезнью Альцгеймера (БА). Лимфоциты выделяли из периферической крови обследуемых лиц и замораживали в среде для замораживания клеток. Перед проведением исследования лимфоциты размораживали, суспендировали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки крупного рогатого скота и половину клеток облучали при 4°C при действии γ -излучения от источника ^{60}Co на установке “ГУТ-200М” в дозе 2 Гр при мощности дозы 0,75 Гр/мин. Контрольные и облученные лимфоциты культивировали в течение 24 ч, собирали, фиксировали и хранили до проведения анализа числа спонтанных и остаточных фокусов γ H2AX с помощью флуоресцентной микроскопии после окрашивания флуоресцентно-мечеными антителами. При МКСА и БА обнаружено более высокое число остаточных фокусов гистона γ H2AX и количество лимфоцитов, содержащих фокусы, по сравнению со здоровыми добровольцами. Это свидетельствует о снижении способности к репарации ДР ДНК у этих пациентов. Показатели клеточного иммунитета и концентрация провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли- α (TNF- α) в группе обследованных пациентов соответствовали норме. В группе пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА) обнаружена корреляция числа остаточных фокусов γ H2AX с количеством CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов и концентрацией TNF- α в сыворотке крови, что свидетельствует о развитии более сильного нейровоспаления у пациентов со сниженной способностью к репарации ДР ДНК при этой патологии.

Ключевые слова: двунитевые разрывы ДНК; γ H2AX; репарация ДНК; мягкое когнитивное снижение амнестического типа; болезнь Альцгеймера; лимфоциты

DOI: 10.18097/PBMC20206604345

ВВЕДЕНИЕ

Синдром мягкого когнитивного снижения амнестического типа (МКСА) рассматривается как состояние пациентов с таким ухудшением когнитивных функций, включая память, которое представляет собой промежуточную стадию между возрастной нормой и деменцией и характеризуется повышенным риском развития деменции в течение ближайших 3-5 лет. Этот синдром проявляется лёгкими признаками ухудшения памяти и/или общим когнитивным снижением при отсутствии клинической картины/признаков деменции и при исключении возможной связи когнитивного снижения с каким-либо церебральным или системным заболеванием, органной недостаточностью, интоксикацией, депрессией или умственной отсталостью. В настоящее время МКСА считают ранним додементным клиническим этапом болезни Альцгеймера (БА) [1]. БА — заболевание мультифакториальной этиологии, проявляющееся, как правило, в возрасте старше 60 лет и приводящее к прогрессирующему нарушению памяти, изменениям эмоциональной сферы и личности в целом. Это наиболее частая причина деменции у лиц старше 65 лет.

Полагают, что помимо других известных факторов, развитие БА может быть связано с нарушениями в системах репарации одно- или двунитевых разрывов (ДР) ДНК. Такие нарушения могут приводить к накоплению спонтанных (эндогенных) повреждений ДНК в нейронах *in vivo* и, как следствие, к преждевременной гибели этих клеток. Действительно, в нейронах пациентов с БА обнаружено снижение уровня белков комплекса Mre11, который играет важную роль в репарации ДР ДНК [2]. Кроме того, при исследовании посмертных срезов коры головного мозга пациентов без когнитивных нарушений и лиц с БА и МКСА обнаружено увеличение доли нейронов и астроцитов с повышенным числом фокусов гистона γ H2AX, что свидетельствует о присутствии ДР ДНК в этих клетках [3]. Следует отметить, что при появлении ДР большое число молекул гистона γ H2AX связывается с ДНК в области ДР. Окрашивание клеток с ДР ДНК при помощи флуоресцентно-меченых антител к этому белку и последующее исследование с помощью флуоресцентной микроскопии позволяет идентифицировать скопления молекул гистона γ H2AX в области ДР ДНК, которые выглядят как яркие фокусы и могут быть легко подсчитаны. Поэтому

число фокусов гистона γ H2AX рассматривается как суррогатный маркер ДР ДНК. Повышенный уровень повреждений ДНК при БА обнаружен и в олигодендрокитах [4]. Повреждения ДНК в клетках мозга при БА могут накапливаться как в результате усиления процессов окисления, так и из-за снижения активности процессов репарации спонтанных повреждений ДНК [5, 6].

Накопление эндогенных ДР ДНК, оцениваемых по числу фокусов гистона γ H2AX, обнаружено и в лимфоцитах периферической крови пациентов при БА, но не при МКСА [7]. При БА авторы обнаружили увеличение числа спонтанных фокусов γ H2AX в лимфоцитах и количества лимфоцитов, содержащих такие фокусы, а при МКСА был обнаружен сниженный по сравнению с контролем уровень γ H2AX в ответ на облучение лимфоцитов в дозе 1 Гр, что также может свидетельствовать о нарушении процессов репарации ДНК.

Целью настоящей работы было изучение эффективности репарации ДР ДНК, оцениваемых по уровню фокусов γ H2AX, в лимфоцитах здоровых добровольцев и пациентов с когнитивными нарушениями — у больных с МКСА и с БА — через 24 ч после γ -облучения клеток *in vitro* в дозе 2 Гр. Уровень фокусов γ H2AX в облучённых лимфоцитах через 24 ч после воздействия — остаточный уровень ДР ДНК — отражает способность лимфоцитов к репарации ДНК после облучения. Если он близок к спонтанному уровню, то это свидетельствует об эффективной репарации ДР ДНК, в то время как повышенный остаточный уровень фокусов γ H2AX по сравнению со спонтанным отражает сниженную скорость репарации ДР ДНК. Повышенный уровень спонтанных повреждений ДНК может свидетельствовать как о сниженной скорости репарации, так и о повышении токсичных воздействий, в том числе эндогенных, на клетки человека.

МЕТОДИКА

Пациенты и их обследование

Обследовано 30 больных с диагнозом МКСА (52-85 лет, ср. возраст $67,8 \pm 8,9$ лет), 3 пациента с БА (71-77 лет, ср. возраст $72,7 \pm 2,0$ лет) и 27 практически здоровых добровольцев, составивших контрольную группу (26-72 лет, ср. возраст $44,7 \pm 12,0$ лет) без когнитивных расстройств. Критериями включения в основную группу исследования были способность пациента подписать и датировать форму информированного согласия или присутствие законного представителя пациента, который может подписать и датировать форму информированного согласия; возраст 40 и более лет; диагноз БА в соответствии с критериями NINCDS/ADRDA и оценка по шкале минимальной оценки психического статуса (MMSE) ≤ 26 баллов, или диагноз МКСА в соответствии с операциональными критериями МКСА и оценка по шкале MMSE ≥ 27 баллов; оценка по шкале Хачински ≤ 4 ; оценка по гериатрической шкале депрессии ≤ 10 . Участникам исследования проведено общеклиническое обследование, оценка

ряда параметров клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, оценка когнитивных функций с использованием нейропсихологических шкал, забор крови для исследования.

Выделение лимфоцитов из периферической крови

Цельную венозную кровь здоровых добровольцев и пациентов собирали в стерильный флакон, содержащий 0,02 М ЭДТА. Кровь разбавляли в два раза фосфатно-солевым буфером pH 7,4 (ФСБ), наслаивали на раствор Histopaque-1077 ("Sigma-Aldrich", США) в пластиковые конические пробирки на 15 мл ("Corning", США) и центрифугировали 30 мин при 400 g при комнатной температуре. Фракцию мононуклеарных лейкоцитов, содержащую 90% лимфоцитов, собирали в виде кольца на границе раздела между плазмой и средой разделения. Клетки промывали 3 раза раствором ФСБ, суспендировали в среде для замораживания (90% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ) и 10% диметилсульфоксида (ДМСО)), выдерживали 30 мин при 4°C, после чего замораживали при постепенном понижении температуры до -80°C. Через 24-48 ч образцы переносили в криохранилище и хранили в парах жидкого азота до проведения исследования.

Облучение клеток

Перед облучением лимфоциты быстро размораживали, помещая ампулы с клетками в водяную баню при 40°C. Оттаявшую суспензию клеток быстро переносили в стерильную пробирку с 10 мл культуральной среды RPMI 1640, клетки собирали при центрифугировании и осадок лимфоцитов промывали этой же средой для удаления следов ДМСО. Лимфоциты суспендировали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной ФСБ, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (полная культуральная среда — ПКС). В суспензии подсчитывали число живых клеток, используя краситель трипановый синий для учета нежизнеспособных клеток, количество которых не превышало 1,5%. Суспензию лимфоцитов в концентрации 10 млн клеток/мл в пластиковых пробирках, помещали в ледяную баню и облучали при 4°C при действии γ -излучения от источника ^{60}Co на установке "ГУТ-200М" в дозе 2 Гр при мощности дозы 0,75 Гр/мин.

Анализ образования ДР ДНК и их репарации

Уровень ДР ДНК оценивали по числу фокусов гистона γ H2AX с помощью флуоресцентной микроскопии. Для этого сразу после облучения контрольные и облучённые клетки в ПКС в концентрации 2 млн/мл в 0,5 мл ПКС помещали в 24-луночные культуральные планшеты ("Corning") и инкубировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе необходимое время. После окончания инкубации клетки собирали, 2 раза промывали ФСБ, осадок клеток суспендировали в охлажденном до -20°C 96% этаноле так, чтобы его конечная концентрация составляла 70%, а концентрация клеток — 3×10^6 /мл,

и хранили при -20°C . Анализ проводили, как описано ранее [8]. Образцы инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в растворе для блокировки: ФСБ, содержащем 3% ФСБ и 0,05% Твин-20, pH 7,4, затем в блокирующем растворе с первичными моноклональными мышиными антителами к гистону γH2AX ("Merck Millipore", Германия) в концентрации 1 мкг/мл (разведение 1:1000) при 4°C в течение ночи. По окончании инкубации с первичными антителами образцы промывали ФСБ с 3% ФСБ и инкубировали со вторичными поликлональными козьими антителами, мечеными Alexa Fluor 488 ("Biolegend", США) в концентрации 0,25 мкг/мл (разведение 1:2000) при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем пробы промывали ФСБ и инкубировали в растворе DAPI (0,3 мкМ) 10 мин при комнатной температуре для окрашивания ядер. При подготовке препаратов для микроскопии следовали методике [9] с некоторыми модификациями. Клетки ресуспендировали в 50 мкл ФСБ, наносили каплями объемом по 2-3 мкл на покровное стекло диаметром 12 мм и высушивали в потоке воздуха в ламинарном шкафу при комнатной температуре. Затем препараты заключали в мовиол. Флуоресценцию анализировали с помощью микроскопа AxioImager D2 с флуоресцентным модулем и камерой Axio Cam MRc5 ("Carl Zeiss", Германия) с использованием программы Axio Vision ("Carl Zeiss"). Фотографировали не менее 10 случайных полей зрения с использованием иммерсионного объектива 100 \times и подсчитывали по фотографиям общее число ядер и число фокусов, после чего рассчитывали среднее число фокусов на 1 ядро. Анализировали не менее 50 ядер.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерной программы "Origin". Данные представляли в виде средних значений и стандартной ошибки среднего. При анализе показателей клеточного иммунитета и содержания $\text{TNF-}\alpha$ в сыворотке крови данные представляли в виде средних значений и доверительного интервала. Достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании состояния системы репарации ДР ДНК в лимфоцитах добровольцев и пациентов

с МКСА и БА анализировали спонтанный уровень ДР ДНК и уровень ДР через 24 ч после γ -облучения клеток в дозе 2 Гр, оцениваемый по числу фокусов гистона γH2AX . На рисунке 1 приведены микрофотографии типичных полей зрения при микроскопическом исследовании контрольных лимфоцитов и клеток с индуцированными облучением фокусами гистона γH2AX в разные промежутки времени после воздействия, а на рисунке 2 показана динамика изменения числа фокусов гистона γH2AX в лимфоцитах здорового добровольца после γ -облучения. Как видно из представленных данных, через 1 ч в лимфоцитах регистрировался высокий уровень фокусов, который снижался в процессе культивирования и через 24 ч после облучения в дозе 2 Гр возвращался к исходному значению. Таким образом, кривая изменения числа фокусов гистона γH2AX после облучения лимфоцитов *in vitro* в дозе 2 Гр носит типичный двухфазный характер с быстрой фазой, завершающейся к 4 ч после облучения, и медленной фазой, заканчивающейся к 24 ч, хотя у части людей полная репарация ДР ДНК может завершаться позднее.

Для анализа спонтанного и остаточного уровня повреждений ДНК у здоровых добровольцев и пациентов с МКСА и БА контрольные и облученные в дозе 2 Гр лимфоциты культивировали в течение 24 ч, после чего клетки фиксировали и анализировали

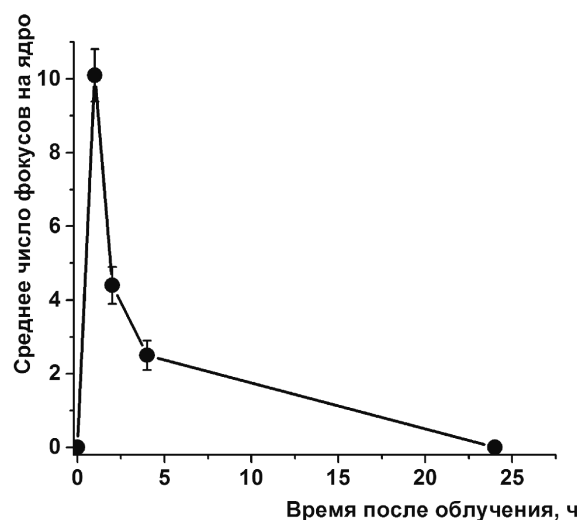


Рисунок 2. Динамика элиминации фокусов гистона γH2AX в лимфоцитах здорового добровольца после γ -облучения *in vitro* в дозе 2 Гр.

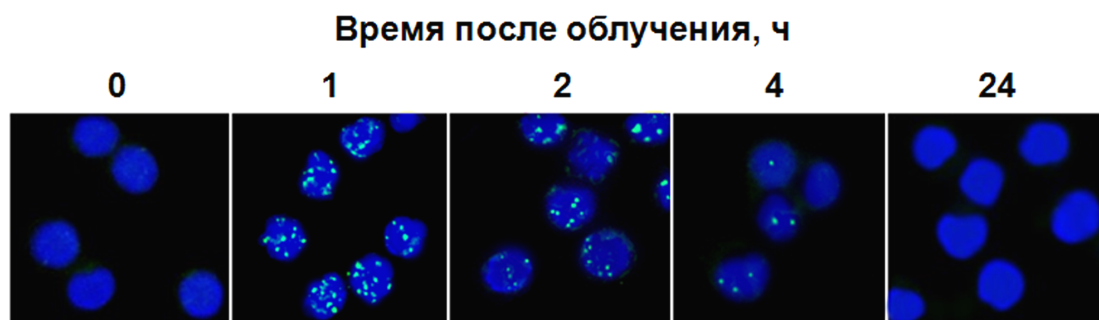


Рисунок 1. Микрофотографии фокусов гистона γH2AX в лимфоцитах здорового добровольца в динамике после γ -облучения *in vitro* в дозе 2 Гр.

в них число фокусов гистона γ H2AX. Полученные результаты представлены на рисунке 3. Среднее число спонтанных фокусов у здоровых лиц составило $0,06 \pm 0,01$, а у лиц с МКСА и БА — $0,10 \pm 0,02$ и $0,13 \pm 0,03$ фокусов на ядро соответственно, статистически значимых различий между этим показателем у обследованных пациентов и здоровых добровольцев не обнаружено ($p > 0,05$). Представленные нами результаты подтверждают данные, полученные ранее Siddiquia и соавт. об отсутствии повышенного уровня эндогенных ДР ДНК у пациентов с синдромом МКСА [7].

У здоровых добровольцев и у пациентов с МКСА и БА средний уровень остаточных фокусов в лимфоцитах составил $0,13 \pm 0,02$, $0,32 \pm 0,03$ и $0,50 \pm 0,15$ фокусов на ядро соответственно. Число остаточных фокусов достоверно превышало уровень спонтанных фокусов во всех группах ($p = 0,006$ для здоровых добровольцев и $p < 10^{-5}$ для пациентов с МКСА и БА). При этом уровень остаточных фокусов в лимфоцитах пациентов с МКСА и БА достоверно превышал этот показатель у здоровых добровольцев ($p < 10^{-4}$), что свидетельствует о сохранении в клетках этих пациентов более высокого уровня индуцированных ДР ДНК через 24 ч после облучения и об их более медленной репарации (рис. 3). Анализ данных, полученных для всей группы обследованных лиц, позволил обнаружить значимую корреляцию между уровнем спонтанных и остаточных фокусов гистона γ H2AX (уравнение линии регрессии $y = 0,17 + 0,83x$; $p = 0,004$; $R = 0,4$). Это позволяет заключить, что у лиц с более высоким уровнем спонтанных ДР ДНК из-за действия эндогенных повреждающих факторов и/или более медленной их репарации, имеет место и более медленная репарация повреждений, вызванных действием гамма-излучения.

Известно, что величина остаточного уровня ДР ДНК при действии генотоксических факторов является показателем индивидуальной

чувствительности к сложным повреждениям ДНК, которые могут быть летальными [10], и что уровень остаточных фокусов коррелирует с клеточной радиочувствительностью [11]. Снижение скорости репарации ДР ДНК в лимфоцитах, уменьшение уровня белков репарации в нейронах [2], а также увеличение доли нейронов и астроцитов, содержащих ДР ДНК [3], свидетельствует о повышенной чувствительности к повреждающим воздействиям клеток разных типов у этих пациентов, что по-видимому, обусловлено генетическими факторами. Такими факторами могут быть не только сниженная активность отдельных ферментов системы репарации ДНК, но и генетически обусловленные нарушения метаболизма, приводящие к повышенному уровню метаболитов, вызывающих повреждения ДНК. Накопление повреждений ДНК под действием эндогенных факторов может приводить к гибели части нейронов в таких условиях. Одним из источников эндогенных повреждений ДНК может быть повышенный уровень активных метаболитов кислорода (АМК), обнаруженный при МКСА [12]. Хотя АМК непосредственно и не приводят к образованию ДР ДНК, но при их высокой концентрации возникает повышенное количество модифицированных оснований и однонитевых разрывов, в процессе эксцизионной репарации которых уже формируются ДР ДНК.

Средний уровень фокусов гистона γ H2AX в лимфоцитах определяется числом фокусов в отдельных клетках и количеством лимфоцитов, содержащих фокусы. При анализе количества лимфоцитов, содержащих спонтанные и остаточные фокусы через 24 ч после облучения, было показано следующее (рис. 4). Доля лимфоцитов, содержащих спонтанные фокусы, у здоровых добровольцев и пациентов с МКСА и БА составила $6,4 \pm 1,0\%$, $9,6 \pm 1,6\%$ и $11,3 \pm 3,4\%$ соответственно, статистически значимые различия между этими

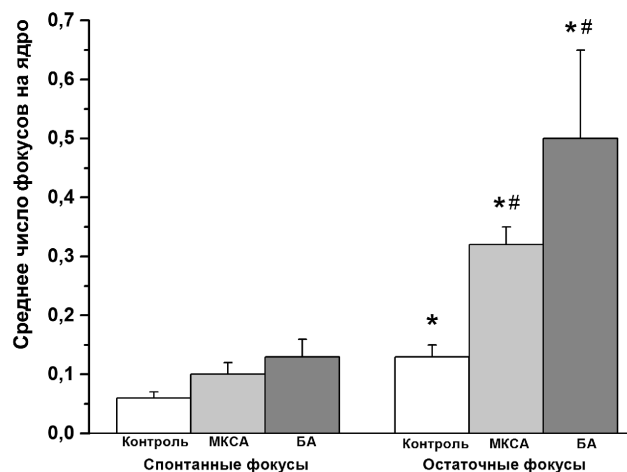


Рисунок 3. Число спонтанных и остаточных фокусов гистона γ H2AX в лимфоцитах здоровых добровольцев (Контроль) и пациентов с МКСА и БА через 24 ч культивирования после γ -облучения лимфоцитов в дозе 2 Гр *in vitro*. * – отличия от соответствующих значений спонтанных фокусов достоверны; # – отличия от уровня остаточных фокусов у здоровых добровольцев достоверны.

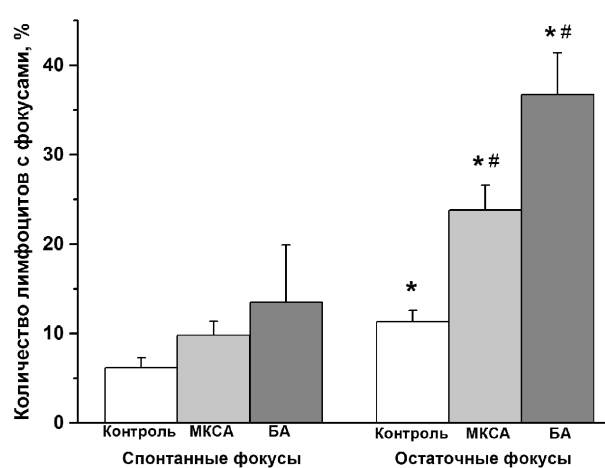


Рисунок 4. Доля лимфоцитов, содержащих спонтанные и остаточные фокусы гистона γ H2AX, у здоровых добровольцев (Контроль) и пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА). * – отличия от соответствующих значений доли лимфоцитов со спонтанными фокусами достоверны; # – отличия от уровня остаточных фокусов у здоровых добровольцев достоверны.

показателями отсутствовали. Количество лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы, через 24 ч после облучения у здоровых добровольцев составило $11,4 \pm 1,4\%$, при МКСА — $24,8 \pm 2,3\%$ и БА — $36,3 \pm 2,7\%$, что достоверно отличается от количества лимфоцитов, содержащих спонтанные фокусы в этих группах ($p < 0,004$; $p < 10^{-6}$; $p < 0,03$ соответственно). При этом доля лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы, при МКСА и БА достоверно превышает количество таких лимфоцитов у здоровых лиц ($p = 9,2 \times 10^{-6}$ и $p = 0,001$ соответственно). Таким образом, у пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА) доля лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы через 24 ч после облучения в дозе 2 Гр, в 2,5 раза превышала количество таких лимфоцитов у здоровых добровольцев.

Средний возраст обследованных добровольцев составлял $44,7 \pm 12,0$ лет и варьировался от 26 до 72 лет, а в группе МКСА+БА — $67,8 \pm 8,9$ лет при различии между пациентами от 52 до 85 лет. В связи с этим было необходимо выяснить вопрос о влиянии возраста обследуемых на изучаемые показатели. Корреляции уровня спонтанных и остаточных фокусов и количества клеток, содержащих фокусы через 24 ч после облучения, с возрастом не обнаружено ни для группы здоровых добровольцев, ни для группы пациентов с когнитивным снижением. Необходимо отметить, что при сравнении активности репарации ДР ДНК, оцениваемой по уровню гистона γH2AX после действия радиомиметика калихемицина в лимфоцитах, полученных от лиц в возрасте от 1 до 16 лет и в возрасте от 77 до 89 лет, также не было обнаружено зависимости уровня репарации ДР ДНК от возраста обследованных [13]. В то же время у людей в возрасте

в диапазоне от 20 до 50 лет было обнаружено увеличение эндогенного уровня γH2AX и снижение уровня остаточных фокусов с возрастом [14]. При определении числа спонтанных фокусов также было показано его увеличение с увеличением возраста от 20 до 50 лет, но отсутствие изменений этого показателя в интервале 50-75 лет [15]. Таким образом, отсутствие зависимости анализируемых показателей от возраста в обследованных нами группах не противоречит литературным данным. Несмотря на это, мы сформировали и проанализировали группы здоровых лиц и обследованных пациентов одинакового диапазона по возрасту, который составил от 52 до 72 лет. Полученные результаты представлены в таблице 1, из которых следует, что обнаруженные закономерности сохранились и при обследовании здоровых лиц и пациентов с МКСА и БА одной возрастной группы. Уровень спонтанных и остаточных фокусов и доля лимфоцитов с остаточными фокусами у здоровых добровольцев в этой группе были незначительно повышены по сравнению со всей группой здоровых лиц, но статистически значимых различий в этих показателях не обнаружено. Число остаточных фокусов и доля лимфоцитов с остаточными фокусами при МКСА и БА достоверно превышали спонтанный уровень и уровень остаточных фокусов в группе здоровых добровольцев, а также долю лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы у здоровых добровольцев (табл. 1).

Сравнение частоты встречаемости лиц с разной долей лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы, в группе здоровых лиц и в группе пациентов с МКСА и БА представлено на рисунке 5. У 92,3% здоровых добровольцев лимфоциты,

Таблица 1. Уровень спонтанных и остаточных фокусов гистона γH2AX в лимфоцитах и доля лимфоцитов, содержащих фокусы, у здоровых добровольцев (Контроль) и пациентов с МКСА и БА в анализируемых группах лиц в возрасте от 52 до 72 лет

Анализируемый показатель	Контроль	МКСА	БА
Спонтанные фокусы γH2AX , число/ядро	$0,11 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$
Остаточные фокусы γH2AX , число/ядро	$0,19 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,04^*$	$0,50 \pm 0,15^*$
Доля лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы, %	$14,9 \pm 1,8$	$24,0 \pm 2,4^*$	$36,3 \pm 2,7^*$

Примечание: * – отличия от значений в соответствующей контрольной группе достоверны.

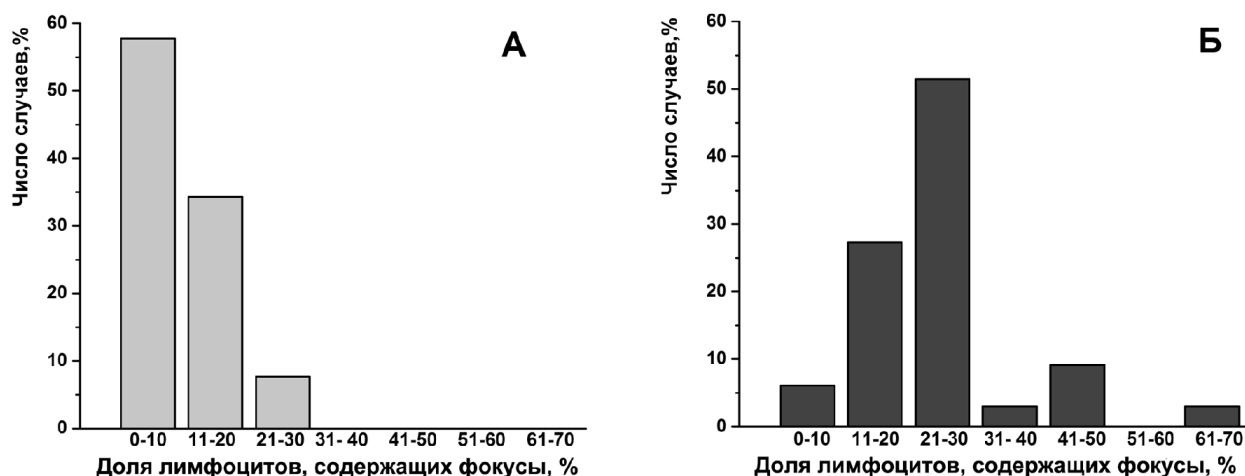


Рисунок 5. Сравнение частоты встречаемости лиц с разной долей лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы гистона γH2AX , в группах здоровых добровольцев (А) и пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА) (Б).

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

содержащие остаточные фокусы, составляют менее 20%, из них у 57,7% лиц лимфоциты с фокусами составляют менее 10% клеток (рис. 5А). В то же время в группе МКСА+БА только у 30,3% лиц лимфоциты, содержащие остаточные фокусы, составляют менее 20%, а у остальных 69,7% пациентов остаточные фокусы обнаруживаются в значительно большем числе лимфоцитов (рис. 5Б).

Характеристика показателей клеточного иммунитета пациентов с МКСА и БА и концентрация TNF-α в сыворотке периферической крови представлены в таблице 2. В соответствии с данными предыдущего исследования [16], эти показатели не отличались от значений, наблюдаемых в группе здоровых добровольцев. При анализе возможной связи уровня остаточных фокусов с содержанием разных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови пациентов группы МКСА+БА обнаружена корреляция этого показателя только с количеством Т-хелперов — CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (рис. 6А). Известно, что эти клетки являются более радиорезистентными, чем CD3⁺CD8⁺-лимфоциты и В-клетки [17]. Однако, по данным авторов этой работы, при облучении лимфоцитов в использованной нами дозе 2 Гр различия в выживаемости клеток-эффекторов CD69L⁺CD3⁺CD4⁺ и CD69L⁺CD3⁺CD8⁺ были очень незначительны, а субпопуляции наивных клеток памяти и клеток центральной памяти CD69L⁺CD3⁺CD4⁺ и CD69L⁺CD3⁺CD8⁺ были

устойчивы к облучению. Это свидетельствует о том, что обнаруженная нами корреляция не связана с преимущественной гибелью одного из типов лимфоцитов, а, возможно, определяется спектром цитокинов, секретируемых CD3⁺CD4⁺-лимфоцитами. В частности, значительный интерес может представлять уровень TNF-α — провоспалительного цитокина, который играет важную роль в инициации и регуляции развития цитокинового каскада при воспалительных процессах и формировании отдельных регуляторных субпопуляций лимфоцитов при воспалении [18, 19]. Он секретируется не только активированными макрофагами, но и Т-хелперами — CD3⁺CD4⁺-лимфоцитами [19, 20], а в ЦНС — активированной микроглией в ответ на появление патогенов различной природы, в том числе на отложения β-амилоида при БА, и является одним из медиаторов нейровоспаления.

Концентрация TNF-α в сыворотке крови у обследованной группы пациентов МКСА+БА не отличалась от группы контроля (табл. 2). Следует отметить, что в ряде исследований обнаружено повышение уровня TNF-α в периферической крови пациентов с БА по сравнению со здоровыми добровольцами [16, 21, 22]. Данные по уровню TNF-α при МКСА противоречивы: сообщается как о повышении его концентрации [16], так и об отсутствии такового [22], что свидетельствует о разном уровне нейровоспаления у отдельных пациентов. При анализе связи количества спонтанных

Таблица 2. Показатели клеточного иммунитета и содержание TNF-α в сыворотке крови при синдроме мягкого когнитивного снижения амнестического типа и болезни Альцгеймера по сравнению со здоровыми добровольцами

Фенотип лимфоцитов	Доля лимфоцитов каждого фенотипа, %		
	Здоровые добровольцы	Мягкое когнитивное снижение	Болезнь Альцгеймера
CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,3±2,6	45,2±1,7	47,9±5,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,5±2,4	24,6±1,3	20,9±8,2
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,6±1,6	14,2±1,4	11,9±2,3
CD3 ⁺ CD19 ⁺	7,9±0,8	10,7±0,9	9,1±2,8
TNF-α, пг/мл	1,28±0,27	1,50±0,32	—

Примечание: приведены средние значения ± доверительный интервал.

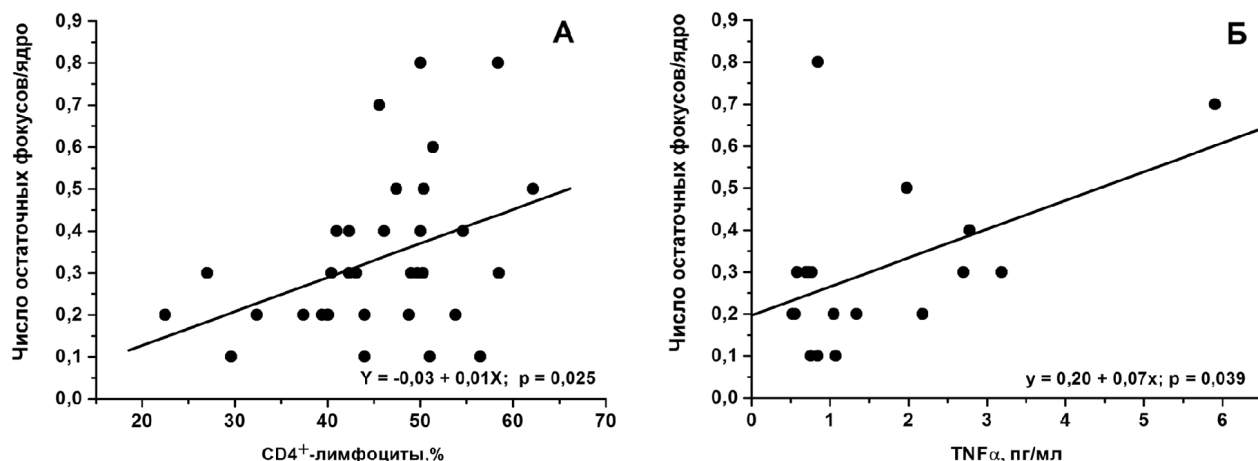


Рисунок 6. Корреляция числа остаточных фокусов гистона γH2AX в лимфоцитах пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА) с количеством CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов (А) и концентрацией TNF-α в сыворотке крови (Б).

и остаточных фокусов γ H2AX с концентрацией TNF- α показано, что только количество остаточных фокусов γ H2AX в лимфоцитах пациентов с когнитивным снижением коррелировало с уровнем TNF- α ($y = 0,20 + 0,07x$; $p = 0,039$; $R = 0,49$, рис. 6Б). Таким образом, у пациентов группы МКСА+БА с более низкой способностью к репарации ДР ДНК наблюдаются более глубокие нарушения гомеостаза, отражением которых является повышенный уровень провоспалительного цитокина TNF- α .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате изучения индивидуальных различий в эффективности репарации ДР ДНК, оцениваемых по уровню остаточных фокусов γ H2AX через 24 ч после γ -облучения лимфоцитов в дозе 2 Гр, при синдроме МКСА и при БА обнаружено более высокое число остаточных фокусов гистона γ H2AX в лимфоцитах и доли лимфоцитов, содержащих остаточные фокусы, по сравнению со здоровыми добровольцами, что свидетельствует о сниженной скорости репарации ДР ДНК в лимфоцитах этих пациентов. Достоверных различий в уровне эндогенных (спонтанных) ДР ДНК при МКСА и БА по сравнению со здоровыми добровольцами не установлено. Обнаружена значимая корреляция между уровнем спонтанных и остаточных фокусов гистона γ H2AX в группе обследованных лиц. Это позволяет заключить, что у людей с более высоким уровнем спонтанных ДР ДНК, появляющихся под действием эндогенных повреждающих факторов и/или их более медленной репарации, имеет место более медленная репарация повреждений, вызванных действием γ -излучения. Показатели клеточного иммунитета и уровень TNF- α в сыворотке крови у обследованных пациентов с МКСА и БА статистически значимо не отличались от группы здоровых добровольцев. В группе пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА) обнаружена корреляция количества остаточных фокусов с количеством Т-хелперов — CD3⁺CD4⁺-лимфоцитов — и с концентрацией провоспалительного цитокина TNF- α в сыворотке крови, в секрети которого могут участвовать активированные Т-хелперы.

Таким образом, у обследованных пациентов с когнитивным снижением (МКСА+БА) обнаружена сниженная способность к репарации индуцированных γ -излучением ДР ДНК. Корреляция сниженного уровня репарации ДР ДНК, регистрируемого по уровню остаточных фокусов γ H2AX, с повышенной концентрацией провоспалительного цитокина TNF- α в сыворотке крови пациентов свидетельствует о развитии более сильного нейровоспаления у пациентов со сниженной способностью к репарации ДР ДНК при этой патологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках выполнения Государственного задания Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Перед включением в исследование пациенты и их родственники были ознакомлены с протоколом исследования и подписали форму добровольного информированного согласия. Исследование было одобрено этическим комитетом Научного центра психического здоровья.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова С.И. (2005) Consilium medicum, **7**(2), 153-157. [Gavrilova S.I. (2005) Consilium medicum, **7**(2), 153-157.]
2. Jacobsen E., Beach T., Shen Y., Li R., Chang Y. (2004) Brain Res. Mol. Brain Res., **128**(1), 1-7.
3. Shanbhag N.M., Evans M.D., Mao W., Nana A.L., Seeley W.W., Adame A., Rissman R.A., Masliah E., Mucke L. (2019) Acta Neuropathol. Commun., **7**(1), 77. DOI: 10.1186/s40478-019-0723-5
4. Tse K.H., Cheng A., Ma F., Herrup K. (2018) Alzheimers Dement., **14**, 664-679.
5. Lovell M.A., Gabbita S.P., Markesbery W.R. (1999) J. Neurochem., **72**, 771-776.
6. Lovell M.A., Xie C., Markesbery W.R. (2000) Brain Res., **855**, 116-123.
7. Siddiquia M.S., Francois M., Heckerc J., Faunt J., Fenecha M.F., Leiferta W.R. (2018) Mutat. Res. Gen. Tox. En., **829-830**, 6-18.
8. Москалева Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. (2017) Радиационная биология. Радиоэкология, **57**(3), 245-256. [Moskaleva E.Y., Semochkina Y.P., Rodina A.V., Chukalova A.A., Posypanova G.A. (2017) Radiation biology. Radioecology, **57**(3), 245-256.]
9. Johansson P., Muslimovic A., Hultborn R., Fernström E., Hammarsten O. (2011) BioTechniques, **51**, 185-189.
10. Banáth J.P., Klovov D., MacPhail S.H., Banuelos C.A., Olive P.L. (2010) BMC Cancer, **10**, 4. DOI: 10.1186/1471-2407-10-4
11. Taneja N., Davis M., Choy J.S., Beckett M.A., Singh R., Kron S.J., Weichselbaum R.R. (2004) J. Biol. Chem., **279**(3), 2273-2280.
12. Lovell M.A., Markesbery W.R. (2007) Nucleic Acids Res., **35**(22), 7497-7504.
13. Ismail I.H., Wadhwa T.I., Hammarsten O. (2007) Nucleic Acids Res., **35**(5), e36. DOI: 10.1093/nar/gkl1169.
14. Sharma P.M., Ponnaiya B., Taveras M., Shuryak I., Turner H., Brenner D.J. (2015) PloS ONE, **10**(3), e0121083. DOI: 10.1371/journal.pone.0121083
15. Sedelnikova O.A., Horikawa I., Redon C., Nakamura A., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M. (2008) Aging Cell, **7**, 89-100.
16. Малашенкова И.К., Крынский С.А., Хайлов Н.А., Огурцов Д.П., Пономарева Е.В., Гаврилова С.И., Дидковский Н.А. (2018) Аллергология и иммунология, **19**(4), 206-213. [Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Hailov N.A., Ogurtsov D.P., Ponomareva E.V., Gavrilova S.I., Didkovsky N.A. (2018) Allergy and Immunology, **19**(4), 206-213.]
17. Schmitz A., Bayer J., Dechamps N., Goldin L., Thomas G. (2007) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., **68**(4), 1169-1177.

18. Sedger L.M., McDermott M.F. (2014) Cytokine Growth Factor Rev., **25**(4), 453-472.
19. Bystrom J., Clanchy F.I., Taher T.E., Mangat P., Jawad A.S., Williams R.O., Mageed R.A. (2018) Cytokine, **101**, 4-13.
20. Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Юрова К.А. (2017) Бюллетень сибирской медицины, **16**(4), 207-219. [Litvinova L.S., Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Yurova K.A. (2017) Bulletin of Siberian Medicine, **16**(4), 207-219.]
21. Swardfager W., Lanctot K., Rothenburg L., Wong A., Cappell J., Herrmann N. (2010) Biol. Psychiatry, **68**, 930-941.
22. Kim Y.S., Lee K.J., Kim H. (2017) Psychogeriatrics, **17**, 224-230.

Поступила в редакцию: 03. 04. 2020.
После доработки: 07. 07. 2020.
Принята к печати: 09. 07. 2020.

EFFECTIVENESS OF THE DNA DOUBLE-STRAND BREAKS REPAIR SYSTEM IN LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH COGNITIVE IMPAIRMENTS AND HEALTHY VOLUNTEERS

Yu.P. Semochkina¹, E.Yu. Moskaleva^{1}, I.K. Malashenkova¹, S.A. Krynskiy¹,
N.A. Hailov¹, D.P. Ogurtsov¹, E.V. Ponomareva², S.I. Gavrilova²*

¹NRC Kurchatov Institute,
1 Akademika Kurchatova sq., Moscow, 123182 Russia; *e-mail: Moskaleva_EY@nrcki.ru
²Mental Health Research Center, 34 Kashirskoe shosse, Moscow, 115522 Russia

The individual differences in the efficiency of DNA DSB repair were estimated by the level of residual γ H2AX foci after γ -irradiation at a dose of 2 Gy, in lymphocytes of patients with amnesic mild cognitive impairment (AMCI) and Alzheimer's disease (AD) and of healthy volunteers. Lymphocytes were isolated from the peripheral blood of the examined patients and were frozen in a medium for freezing cells. Before the study, the lymphocytes were thawed, suspended in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, and half of the cells were γ -irradiated at 4°C from a ^{60}Co source on a GUT-200M facility at a dose of 2 Gy (a dose rate of 0.75 Gy/min). Control and irradiated lymphocytes were cultured for 24 h, collected, fixed, and stored until the study of the number of spontaneous and residual foci of γ H2AX using fluorescent microscopy after staining with fluorescent labeled antibodies. In lymphocytes of patients with AMCI and AD a higher number of residual γ H2AX foci in lymphocytes and the higher number of lymphocytes with foci were found compared with healthy volunteers. This indicates a decrease in the ability to repair DNA DSB in these patients. Indicators of cellular immunity and the concentration of TNF- α in the blood serum in the group of examined patients were normal. In the group of patients with the cognitive impairments (AMCI+AD), a correlation was found between the number of residual foci of γ H2AX and the number of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes and the concentration of proinflammatory cytokine TNF- α in the blood serum. This suggests the development of stronger neuroinflammation in patients with reduced ability to repair DNA DSB in this pathology.

Key words: DNA double-strand breaks; γ H2AX; DNA repair; amnesic mild cognitive impairment; Alzheimer's disease; lymphocytes

Funding. The research was carried out within the State Assignment for the NRC "Kurchatov Institute".

Received: 03.04.2020, revised: 07.07.2020, accepted: 09.07.2020.