

УДК 57.043

КОМБИНИРОВАННОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ГАММА-КВАНТАМИ И ЯДРАМИ УГЛЕРОДА УВЕЛИЧИВАЕТ СОДЕРЖАНИЕ LIP-ИЗОФОРМЫ C/EBP-β В ГИПОФИЗЕ КРЫС

Академик РАН И. П. Анохина¹, П. К. Анохин¹, В. С. Кохан^{2,*}

Поступило 07.05.2019 г.

C/EBP-β – транскрипционный фактор с лейциновой “молнией”, вовлечённый в регуляцию иммунного и воспалительного ответа организма. Крысы Wistar, подвергнутые комбинированному действию ионизирующего излучения, характеризовались увеличением содержания LIP-изоформы C/EBP-β в гипофизе. Полученные данные указывают, что умеренные дозы ионизирующего излучения порождают стресс эндоплазматического ретикулума и, вероятно, инициируют C/EBP-β -опосредованную клеточную гибель по апоптотическому сценарию. В настоящем исследовании также находит подтверждение ранее высказанная гипотеза об альтерациях гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы в ответ на действие умеренных доз ионизирующего излучения.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, C/EBP-β, гипофиз.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524881108-111>

Ионизирующее излучение (ИИ), представленное прежде всего тяжёлыми заряженными частицами высоких энергий (ТЗЧ), является одним из основных лимитирующих факторов пилотируемых дальних космических миссий [1]. Несмотря на интенсивные исследования, влияние умеренных доз ТЗЧ на ЦНС остаётся малоизученным.

Исследования моноаминергических нейросетей в миндалине и гипоталамусе показали, что воздействие умеренных доз комбинированного облучения (γ-кванты и ядра ¹²C) приводит к активации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной (НРА) системы [2, 3]. Гипофиз, будучи нейроэндокринным звеном между гипоталамусом и надпочечниками, выполняет также ряд иных функций, оказывается вовлечённым в регуляцию репродуктивной системы, модуляцию нейромедиаторных систем в пределах ЦНС, синтез ряда гормонов стресса и регулирующих обмен веществ [4, 5]. C/EBP-β — транскрипционный фактор с лейциновой “молнией”, вовлечённый в регуляцию иммунного и воспалительного ответа организма, для которого была показана высокая экспрессия в гипофизе. Альтернативная трансляция с различных AUG кодонов без сдвига рамки считывания даёт три изоформы белка: LAP* (38 кДа),

LAP (34 кДа) и LIP (20 кДа) [6]. Влияние ИИ на экспрессию C/EBP-β в гипофизе ранее не изучалось.

Целью настоящего исследования было установить влияние комбинированного ИИ на содержание LAP*-, LAP- и LIP-изоформ белка C/EBP-β в гипофизе крысы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на 14 крысах Wistar массой 160–180 г. Животные были разделены на две равные группы: С – виварийный контроль и R – подвергнутые облучению. Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Крысы R-группы были подвергнуты суточному γ-облучению (400 мГр; 661,7 кЭВ) и через 3 сут получили острое облучение головы ядрами ¹²C (450 МэВ; 0,14 Гр). На 25-й день после облучения крысы были подвергнуты эвтаназии путём декапитации. Гипофиз был препарирован на льду и немедленно заморожен в жидком азоте.

Суммарную РНК экстрагировали с использованием TRIzol (“Evrogen”, Россия) по стандартному фенол-хлороформному протоколу. Для синтеза кДНК использовали 2 мкг тотальной РНК. Обратную транскрипцию выполняли с помощью набора MMLV RT со случайными гексамерными праймерами (“Evrogen”, Россия). Для проведения ПЦР использовали смесь qPCRmix-HS SYBR (“Evrogen”, Россия). Реакция происходила в термоциклере BioRad CFX96 (“Bio-Rad Laboratories”, США). Расчёт экспрессии избранных генов производили

¹ Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Москва

² Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской Академии наук, Москва

* E-mail: viktor_kohan@hotmail.com

методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ с β -актином в качестве гена сравнения. Кривые плавления были проанализированы для подтверждения специфичности реакции. Последовательности праймеров: С/ЕВР- β 5'-ACCGGGTTTCGGGACTTGA-3' (прямой) и 5'-CCCGCAGGAACATCTTTAAGTGA-3' (обратный); β -актин 5'-CACTGCCGCATCCTCTTCCCT-3' (прямой) и 5'-AACCGCTCATTGCCGATAGTG-3' (обратный).

Ткань гипофиза была механически гомогенизирована на льду в Тритон X буфере, полученный лизат центрифугировали при +3 °С 10 000 g 20 мин. К супернатанту был добавлен эквивалентный объём двукратного буфера Леммли, смесь была термостатирована при 95 °С в течение 5 мин и 10 мкл наносили на гель. Электрофорез проводили в градиентном геле, содержащем 4–20% акриламида ("Biorad", США). Полусухой электрофоретический перенос осуществляли на PVDF мембрану, для блокировки которой использовали 4%-е молоко. Антитела разводили в стандартном буфере PBS/T с добавлением 4%-го сухого молока. Хемилюминисцентную визуализацию производили с помощью набора Optiblot ECL Detect Kit ("Abcam", США) на установке ChemiDoc MP ("Biorad", США). В работе использовали кроличьи моноклональные антитела к С/ЕВР- β в разведении 1:1000 (ab32358), мышинные моноклональные антитела к β -актину в разведении 1:5000 (ab8226), а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: козы к IgG кролика в разведении 1:5000 (ab205718) и к IgG мыши (ab205719) производства "Abcam", США.

Статистическая обработка результатов. Данные представляли как среднее \pm S.E.M. Стандартную обработку данных проводили с помощью программы Statistica 12 ("StatSoft Inc.", США). Анализ данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как и следовало ожидать, уровень экспрессии мРНК С/ЕВР- β в группе R-крыс был неотличим от значения у контрольных животных (рис. 1).

Напротив, анализ продуктов трансляции показал, что содержание LIP-изоформы С/ЕВР- β в группе R-крыс было в 1,76 ($t = 2,2$; $p = 0,04$) раз больше значения в группе С-крыс (рис. 2).

Таким образом, ИИ повлияло на экспрессию LIP-изоформы С/ЕВР- β на уровне трансляции. Известно, что образование того или иного продукта трансляции мРНК С/ЕВР- β регулируется несколькими механизмами. Так, стартовые кодоны для

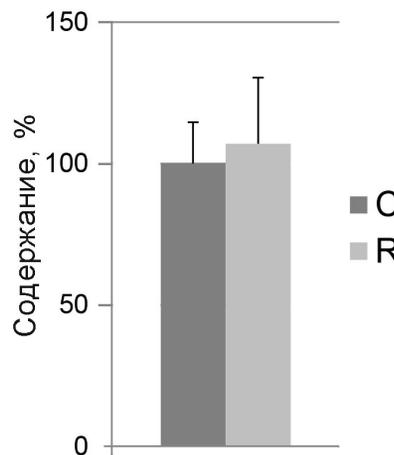
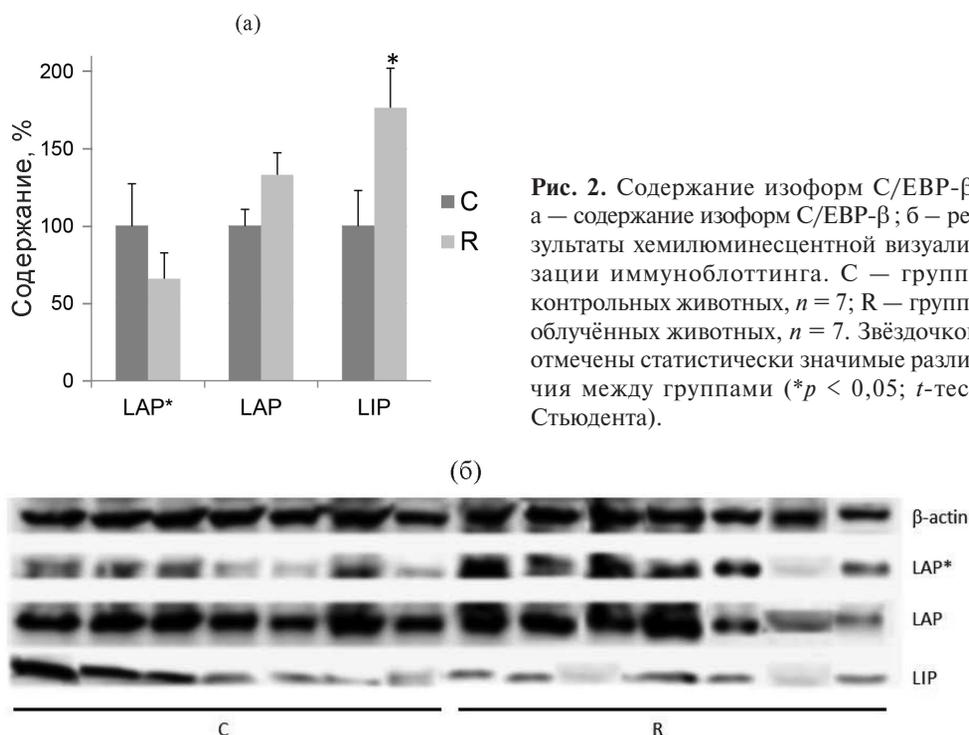


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК С/ЕВР- β . С – группа контрольных животных, $n = 7$; R – группа облучённых животных, $n = 7$.

LAP*- и LAP-изоформ окружены неоптимальными консенсусными последовательностями Козак, тогда как стартовый кодон для LIP-изоформы имеет оптимальное окружение, что играет значительную роль при ослабленном рибосомном сканировании [6, 7]. Кроме того, трансляция LIP-изоформы регулируется ингибитором белка-мишени рапамицина млекопитающих, который непосредственно увеличивает количество доступных факторов инициации трансляции эукариот eIF4E [6], а также путём ассоциации CUG-связывающего белка 1 (CUG-BP1) с мРНК С/ЕВР- β [8].

Известно, что изоформы С/ЕВР- β обладают доменом трансактивации и выполняют роль активатора, тогда как LIP-изоформа не содержит подобного домена, но может димеризоваться и связываться как с ДНК, так и с LAP-изоформами (образуя гетеродимеры) и выполняет роль репрессора транскрипции. Баланс LIP-/LAP-изоформ С/ЕВР- β предопределяет судьбу клетки и является маркером стресса эндоплазматического ретикулума [6]. Таким образом, увеличение содержания LIP-изоформы свидетельствует о накоплении несвёрнутого белка и индукции стресса эндоплазматического ретикулума. Было показано, что повышение экспрессии LIP-изоформы ведёт к подавлению экспрессии факторов выживания, кодируемых генами-мишенями *ATF4*, и усилению экспрессии ряда генов клеточной гибели, ассоциированных с повышенной экспрессией СНОР (маленький ядерный белок, который активно димеризуется с членами семейства С/ЕВР- β) [9]. Эти данные хорошо согласуются с ранее выявленным ростом числа апоптотических клеток в ответ на действие ИИ [10].



Нарушению гиппокампального нейрогенеза в ответ на действие ИИ всецело опосредовано воспалительной реакцией нервной ткани [1]. Вместе с тем альтерации НРА-системы ассоциированы со снижением экспрессии нейротрофического фактора мозга в гиппокампе [11]. Более того, экспрессия C/EBP-β необходима для транскрипции гена циклоксиогеназы-2 — ключевого провоспалительного фермента [12]. В свете этого эффекты умеренных доз ИИ на уровне гипофиза могут быть вовлечены в нарушении гиппокампального нейрогенеза.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 17–74–10079.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kokhan V.S., Matveeva M.I., Mukhametov, A., Shtemberg A.S. // *Neurosc. Biobehav. Rev.* 2016. V. 71. P. 621–632.
- Kokhan V.S., Shakhbazian E.V., Markova N.A. // *Behav. Brain Res.* 2019. V. 362. P. 311–318.
- Elsayed S.A., Bhimji S.S. // *Physiology, Pituitary Gland*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019.
- Musumeci G., Castorina S., Castrogiovanni P., Loreto C., Leonardi R., Aiello F.C., Magro G., Imbesi R. // *Acta Histochem.* 2015. V. 117. № 4/5. P. 355–366.
- Li Y., Bevilacqua E., Chiribau C.B., Majumder M., Wang C., Croniger C.M., Snider M.D., Johnson P.F., Hatzoglou M. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 33. P. 22443–22456.
- Calkhoven C.F., Muller C., Leutz A. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 15. P. 1920–1932.
- Wethmar K., Smink J.J., Leutz A. // *Bioessays.* 2010. V. 32. № 10. P. 885–893.
- Timchenko N., Wang A.G. L., Timchenko L.T. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 21. P. 20 549–20 557.
- Zhang K., Kaufman R.J. // *Neurology.* 2006. V. 66. № 2. Suppl 1. P. 102–109.
- Fan Y., Liu Z., Weinstein P.R., Fike J.R., Liu J. // *Eur. J. Neurosci.* 2007. V. 25. № 1. P. 38–46.
- Haddad L., Evans J.C., Gharani N., Robertson C., Rush K., Wiltshire S., Frayling T.M., Wilkin T.J., Demaine A., Millward A., Hattersley A.T., Conway G., Cox N.J., Bell G.I., Franks S., McCarthy M.I. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 87. № 6. P. 2606–2610.
- Sun H., Sheveleva E., Xu B., Inoue H., Bowden T.G., Chen Q.M. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2008. V. 295. № 4. P. 915–922.

COMBINED IRRADIATION BY GAMMA RAYS AND CARBON NUCLEI INCREASES THE C/EBP- β LIP-ISOFORM CONTENT IN THE PITUITARY GLAND OF RATS

Academician of the RAS **I. P. Anokhina**¹, **P. K. Anokhin**¹, **V. S. Kokhan**²

¹ *V.P. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation*

² *Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Received May 7, 2019

C/EBP- β , a basic leucine zipper transcription factor, has important roles in the regulation of organism's immune and inflammatory responses. Wistar rats subjected to the combined irradiation were characterized by an increase in the content of C/EBP- β LIP-isoform in the pituitary gland. The obtained data indicate that moderate doses of ionizing radiation to initiate the endoplasmic reticulum stress response and are likely to initiate C/EBP- β -mediated cell death according to the apoptotic scenario. This study also confirms the earlier hypothesis about the alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in response to moderate doses of ionizing radiation.

Keywords: ionizing radiation, C/EBP- β , pituitary gland.