

ФОРМИРОВАНИЕ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ ИОНОВ КРИПТОНА (^{78}Kr)

*Т. С. Буланова^{а, б, 1}, А. В. Борейко^{а, б}, М. Г. Заднепрянец^{а, б}, Е. А. Красавин^{а, б},
Е. А. Куликова^{а, б}, Е. В. Смирнова^а, Ю. С. Северюхин^{а, б}, Г. Н. Тимошенко^{а, б}*

^а Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

^б Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

На парафиновых срезах головного мозга крыс методом иммуногистохимического окрашивания с использованием специфических к белкам γH2AX и 53BP1 антител изучена индукция и репарация двунитевых разрывов ДНК в гиппокампальной формации при действии ускоренных ионов ^{78}Kr с энергией 2,58 ГэВ/нуклон. Выявлено формирование сложных кластерных ДР ДНК в ряде структур этой формации в различные сроки после воздействия тяжелых ядер. Установлено, что большая часть $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ фокусов находится в составе сложноорганизованных кластеров ($\sim 80\%$) и локализуется в сайтах визуализированных репарационных белков ($\sim 75\%$) по ходу треков тяжелых заряженных частиц. Показано, что через 24 ч пострадиационной инкубации происходит эффективная элиминация радиационно-индуцированных $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ фокусов в клетках зубчатой фасции и CA1 поля гиппокампа. В клетках зубчатой фасции пик образования $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ фокусов наблюдается через 4 ч после облучения.

The induction and repair of DNA double-stranded breaks in the hippocampal formation after the action of accelerated ^{78}Kr ions with energy of 2.58 GeV/nucleon was studied by the immunohistochemical staining of rat brain paraffin sections using antibodies specific for γH2AX and 53BP1 proteins. The formation of complex DSB DNA clusters in various structures of the hippocampal formation after exposure to heavy nuclei has been revealed. It was established that most of the $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ foci are located within complex clusters ($\sim 80\%$) and are localized at sites of visualized repair proteins ($\sim 75\%$) along the tracks of heavy charged particles. It was shown that 24 h post irradiation incubation, the effective elimination of radiation-induced $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ foci occurs in the cells of the dentate gyrus and CA1 of the hippocampal formation. In the cells of the dentate gyrus, the peak of $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ formation was observed 4 h after irradiation.

PACS: 87.53.-j; 87.19.La; 87.14.Gg

ВВЕДЕНИЕ

Исследования закономерностей и механизмов формирования двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках высших организмов при действии тяжелых заряженных частиц (ТЗЧ) являются крайне актуальными при решении многих вопросов радиационной генетики, космической радиобиологии, радиационной медицины. ДР ДНК представляют

¹E-mail: bulanova_tatyan@mail.ru

собой наиболее тяжелые повреждения генетических структур и являются молекулярным субстратом формирования структурных мутаций различного вида генов, лежащих в основе многих радиационно-индуцированных эффектов. Отличительной особенностью действия ТЗЧ на генетические структуры клеток является формирование кластерных повреждений ДНК [1, 2], в том числе близко расположенных двунитевых разрывов ДНК, что не характерно для ионизирующих излучений электромагнитной природы. Хорошо известно, что с увеличением линейной передачи энергии (ЛПЭ) заряженных частиц возрастает и количество ДР ДНК, формирующихся по ходу трека частицы. При этом возрастает не только количество ДР, но изменяется и характер их сложности (комплексности) [3], что делает затруднительным осуществление репарационных процессов в облученных клетках. В значительной степени это обусловлено высокой плотностью ионизации в клеточных ядрах при прохождении заряженных частиц через генетические структуры [4]. Наблюдающиеся различия в индукции и репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений электромагнитной природы и ТЗЧ ярко отражаются на характере проявления различных радиационно-индуцированных эффектов, в том числе, как можно полагать, на осуществлении высших интегративных функций центральной нервной системы (ЦНС) у животных, облученных рентгеновскими лучами и ускоренными тяжелыми ионами. Установлено [5], что облучение грызунов (крыс) ионами железа с энергией 1 ГэВ/нуклон в дозе 20 сГр через 3 мес после облучения вызывает нарушения пространственной ориентации, угнетение когнитивных функций. В то же время при действии рентгеновских лучей в дозах более 10 Гр таких нарушений не было выявлено. Величина относительной биологической эффективности (ОБЭ) ионов железа по данному критерию облучения достигала значений ~ 50 . Авторы связывают эти нарушения не только с гибелью нейронов (прежде всего, гиппокампа, как наиболее уязвимой в этом случае структуры ЦНС), но и с нарушением механизмов синаптической передачи. С учетом того, что при облучении тяжелыми заряженными частицами повреждения генетических структур и, прежде всего, формирование ДР ДНК характеризуются высокой степенью кластеризации, что, как уже указывалось, совершенно не характерно для излучений электромагнитной природы, можно предположить, что это обстоятельство, как одно из возможных, оказывает существенное влияние на специфику развития радиационных синдромов в ЦНС при действии тяжелых ионов. Радиационные повреждения в генах нервных клеток, приводящих к мутациям различного типа, могут обуславливать экспрессию мутантных форм белков, участвующих в формировании структуры рецепторов, что может сказаться на их нормальном функционировании. Наиболее значимо это может проявляться при возникновении кластерных повреждений ДНК, вызывающих тяжелые нарушения генома и сопровождающихся возникновением структурных мутаций. С учетом этого нами ранее с использованием методов молекулярной динамики [6] было рассмотрено влияние некоторых точковых мутаций в генах GRIN1 и GRIN2b гиппокампальных нейронов крыс на состояние глутаматного НМДА-рецептора. Выявлено двукратное изменение проводимости ионного канала рецептора, включающего мутантные формы белковых субъединиц NR2. По-видимому, можно ожидать еще более существенного влияния на функциональные свойства ионных каналов мутаций структурного типа как результата формирования кластерных ДР ДНК. С учетом важности изучения характера формирования *in vivo* двунитевых разрывов ДНК в нейронах различных отделов головного мозга нами предприняты исследования закономерностей образования двунитевых разрывов ДНК в нейронах головного мозга крыс при действии высокоэнергетичных

тяжелых заряженных частиц, обладающих высокой ЛПЭ, — ускоренных ионов криптона (^{78}Kr). Радиобиологический эксперимент с ядрами, обладающими таким большим зарядом и релятивистской энергией, выполнен впервые.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Краниальное облучение крыс линии *Sprague Dawley* (23 недели, 295 г) ускоренными ионами ^{78}Kr с энергией 2,58 ГэВ/нуклон выполнено на нуклотроне Лаборатории физики высоких энергий ОИЯИ. Все эксперименты велись в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» (Совет международных медицинских научных организаций (CIOMS) 6 Женева, 1995 г.). Облучение проводили в измерительном павильоне в районе фокуса F3. Профиль выведенного пучка ионов в фокусе F3 измерялся с помощью многопроволочной ионизационной камеры ПИК-3. Для мониторинга интенсивности пучка использовалась специальная ионизационная камера (ИК), разработанная для работы с пучками многозарядных ядер и калиброванная по показаниям пучкового сцинтилляционного счетчика S. Схема размещения оборудования и облучаемых животных в районе фокуса F3 показана на рис. 1.

Интенсивность пучка ионов криптона составляла в F3 $(1-2) \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$ при временной растяжке пучка 2,5–3 с. Специальные измерения показали, что примеси других ионов в пучке нет. Измерения с помощью радиохромной пленки EBT-03 фирмы Gafchromic, размещенной непосредственно за головой облучаемых животных, показали, что в месте облучения пространственное распределение пучка близко к нормальному с шириной на полувысоте около 1 см. Интегральные потоки ионов криптона за время экспозиций (~ 5 мин) составили $(5,3-5,7) \cdot 10^6$ ионов. Расчетное значение ЛПЭ в центре тканей мозга животных составляло 250 кэВ/мкм.

При облучении животные фиксировались в пластиковых контейнерах, исключающих возможность произвольного движения головы. Контрольную группу также помещали в пластиковый фиксатор для имитации стрессовых условий облучения. Настройка пучка ускоренных ионов ^{78}Kr проводилась вручную таким образом, чтобы центр пучка заряженных частиц проходил между ухом и глазом животного. Облучению подверглись в основном полушария головного мозга. Окрашивание среза мозжечка не выявило наличия повреждений в клетках Пуркинье.

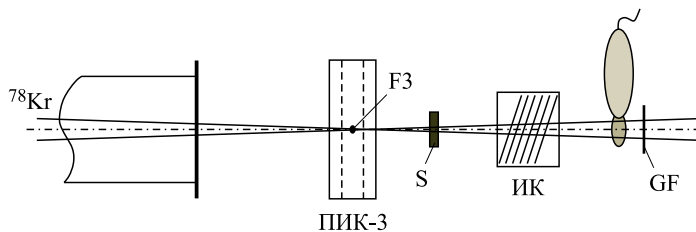
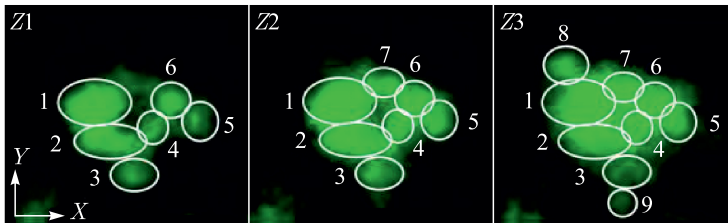


Рис. 1. Схема облучения крыс на пучке ядер криптона: F3 — фокус пучка; ПИК-3 — многопроволочная ионизационная камера; S — сцинтилляционный счетчик; ИК — ионизационная камера; GF — радиохромная пленка

Через 1, 4 и 24 ч после облучения проводили декапитацию и извлечение головного мозга. Ткани мозга помещали в раствор 4%-го параформальдегида в фосфатном буфере на 20 ч. Затем ткани дегидратировали в этаноле (70, 80, 96, 100 %), просветляли в о-ксилоле и заливали в парафин. Нарезку тонких срезов (5 мкм) проводили на ротационном микротоме Microm HM 340E (Thermo Fisher Scientific). Выявление радиационно-индуцированных ДР ДНК осуществлялось методом иммуногистохимического окрашивания парафиновых срезов тканей мозга с использованием первичных к белкам-маркерам ДР ДНК антител — фосфорилированному гистону H2AX (γ H2AX) и репарационному белку 53BP1. Визуализация колокализированных γ H2AX и 53BP1 фокусов осуществлялась с помощью вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой. Подготовка к иммуногистохимическому окрашиванию включала депарафинирование срезов в о-ксилоле и регидратацию в этаноле нисходящей крепости (100, 96, 80, 70, 50 %). Демаскирование антигенов проводили в цитратном буфере (Праймбиомед, рН 6.0) при 95 °С на водяной бане. Пермеабиллизацию проводили в 0,2%-м Triton X-100 в течение 45 мин. Для блокировки неспецифического связывания первичных антител использовали раствор 7,5%-й козьей сыворотки и 7,5%-й эмбриональной телячьей сыворотки в фосфатном буфере. Для связывания с белками-маркерами ДР добавляли первичные моноклональные мышьиные антитела, специфичные к белку γ H2AX (1 : 200, JBW301, Millipore-Upstate, США) и поликлональные кроличьи антитела — к белку 53BP1 (1 : 200, «Abcam», ab175933, США). Визуализацию радиационно-индуцированных фокусов (РИФ)

Изображение γ H2AX кластера фокусов вдоль оси Z (глубина 1,5 мкм)



Изображение γ H2AX кластера фокусов
вдоль оси Z (глубина 1,5 мкм)

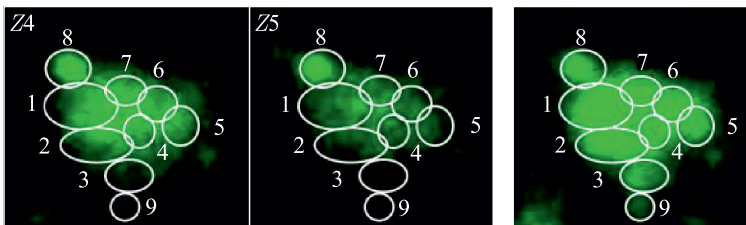


Рис. 2. Кластеризация γ H2AX фокусов в ядре клетки зубчатой фасции гиппокампальной формации крыс через 1 ч после облучения ионами ^{78}Kr . На изображениях Z1–Z5 показаны индивидуальные оптические срезы в плоскостях X–Y, полученные вдоль оси Z с шагом 0,3 мкм, иллюстрирующие изменения количества индивидуальных γ H2AX фокусов, входящих в кластер. Слобноорганизованный γ H2AX кластер состоит из 9 индивидуальных γ H2AX фокусов. На изображении внизу справа продемонстрировано совмещенное изображение γ H2AX кластера фокусов, полученное наложением Z1–Z5 слоев

проводили с использованием флуоресцентных красителей FITC (мышь, 1 : 200, ab97239, «Abcam», США) и Texas Red (кролик, 1 : 400, ab6719, «Abcam», США), конъюгированных с козьими вторичными антителами от Abcam. Раствор DAPI (600нМ, Sigma) и фотозащитной среды Vectashild H-1000 (VectorLaboratories) применялся для окраски ядер. Изображения окрашенных препаратов получали с использованием флуоресцентного микроскопа AxioImager.M2 (Carl Zeiss), оснащенного световой системой оптического секционирования ApoTome.2. Полученный стек изображений вдоль оси Z реконструировался в программе Zen 2012 в псевдотрехмерное (3D) изображение ядра клетки. В дальнейшем изображения анализировались в 3D-геометрии в программе Zen 2012, позволяющей идентифицировать индивидуальные γ H2AX и 53BP1 фокусы на каждом из слоев Z -стека изображений. Такой способ позволял проводить количественную оценку степени кластеризации РИФ. Иллюстрация подсчета индивидуальных фокусов, входящих в γ H2AX кластер, представлена на рис. 2. Подсчет колокализированных γ H2AX/53BP1 кластеров фокусов проводили в 3D-геометрии. Для количественного анализа зависимостей формирования и элиминации колокализированных радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX/53BP1 анализировали не менее 30 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, одной из наиболее чувствительных к действию ионизирующей радиации структур ЦНС является гиппокамп. Эта область состоит из клеток, плотно упакованных в ленточную структуру, которые распределяются вдоль медиальных стенок нижних рогов боковых желудочков мозга в передне-заднем направлении. Гиппокампальную формацию ЦНС подразделяют на «собственно гиппокамп» (поля CA1, CA2 и CA3), зубчатую извилину и субикулум. Собственно гиппокамп подразделяют на проксимальную крупноклеточную и дистальную мелкоклеточную области, причем поля CA3 и CA2 эквивалентны крупноклеточной области, а CA1 — мелкоклеточной [7].

Характерное анатомическое строение гиппокампальной формации в наших исследованиях выявляли по окраске срезов DAPI (рис. 3). Поля гиппокампа — CA1, CA2 и CA3 — дифференцировали по размеру ядер и плотности их расположения в ленточной структуре. Клетки CA1 поля имеют меньшие по размеру ядра с площадью (S), равной $S = (108 \pm 16,9)$ мкм². В CA3 поле площадь ядер составляет — $(145 \pm 5,9)$ мкм² и расстояние между клеточными ядрами ~ 11 мкм.

Ускоренные до релятивистских энергий ядра криптона обладают способностью передавать высокую локальную энергию генетическим структурам при прохождении сердцевины треков через ядра клеток и формировать δ -электронную «шубу», простирающуюся далеко за пределы геометрической оси трека тяжелой заряженной частицы. Моделирование структуры треков ионов ^{78}Kr с энергией 2,58 ГэВ/нуклон с использованием программы RITRACK 3.1 (NASA) позволяет получить важные характеристики использованных в эксперименте тяжелых заряженных частиц. Величина их ЛПЭ составляет ~ 250 кэВ/мкм (рис. 4). Оценка максимального радиуса δ -электронной «шубы» на 1 см пробега частицы в программе GEANT 4 составляет $(6,8 \pm 0,2)$ см [8].

Использование метода иммуногистохимического окрашивания с первичными антителами, специфичными к белку γ H2AX и другим белкам репарации, для выявления повреждений в генетических структурах нейронов облученных животных позволяет визуализировать топографические особенности формирования таких повреждений в мозговых

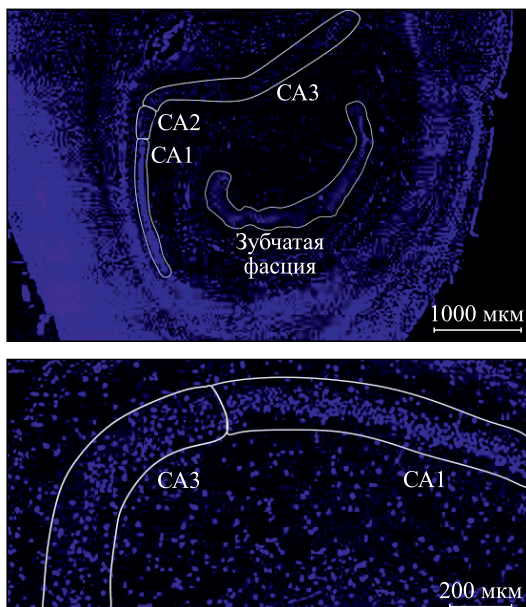


Рис. 3. Анатомия гиппокампальной формации. Окрашивание DAPI ядер клеток среза головного мозга методом иммуногистохимического окрашивания ($\times 100$ увеличение)

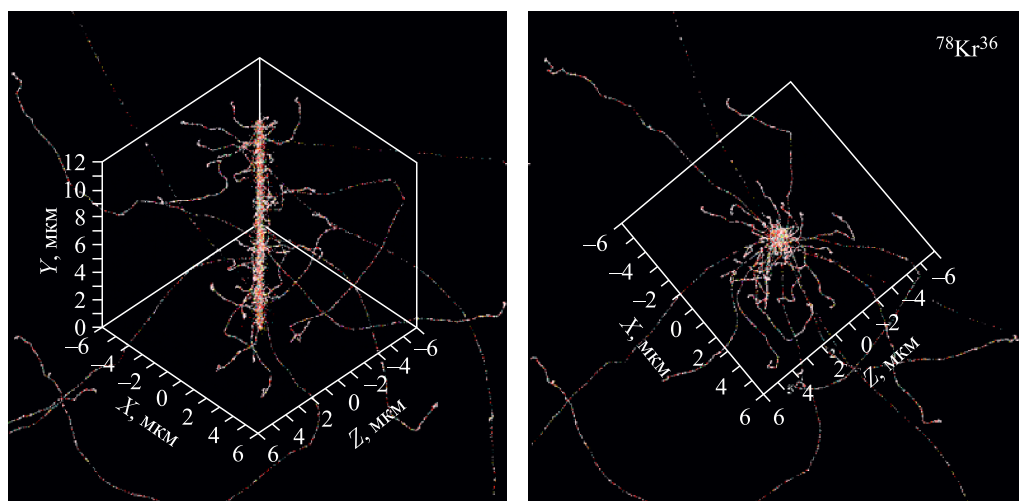


Рис. 4. Моделирование структуры треков ионов $^{78}\text{Kr}^{36}$ с энергией 2,58 ГэВ/нуклон с использованием программы RITRACK 3.1 (NASA)

структурах. Анализ характера локализации индуцированных в ядрах нейронов повреждений свидетельствует о том, что наиболее часто они располагаются в виде «треков» по ходу пересекающих облучаемые области мозга заряженных частиц (рис. 5, а).

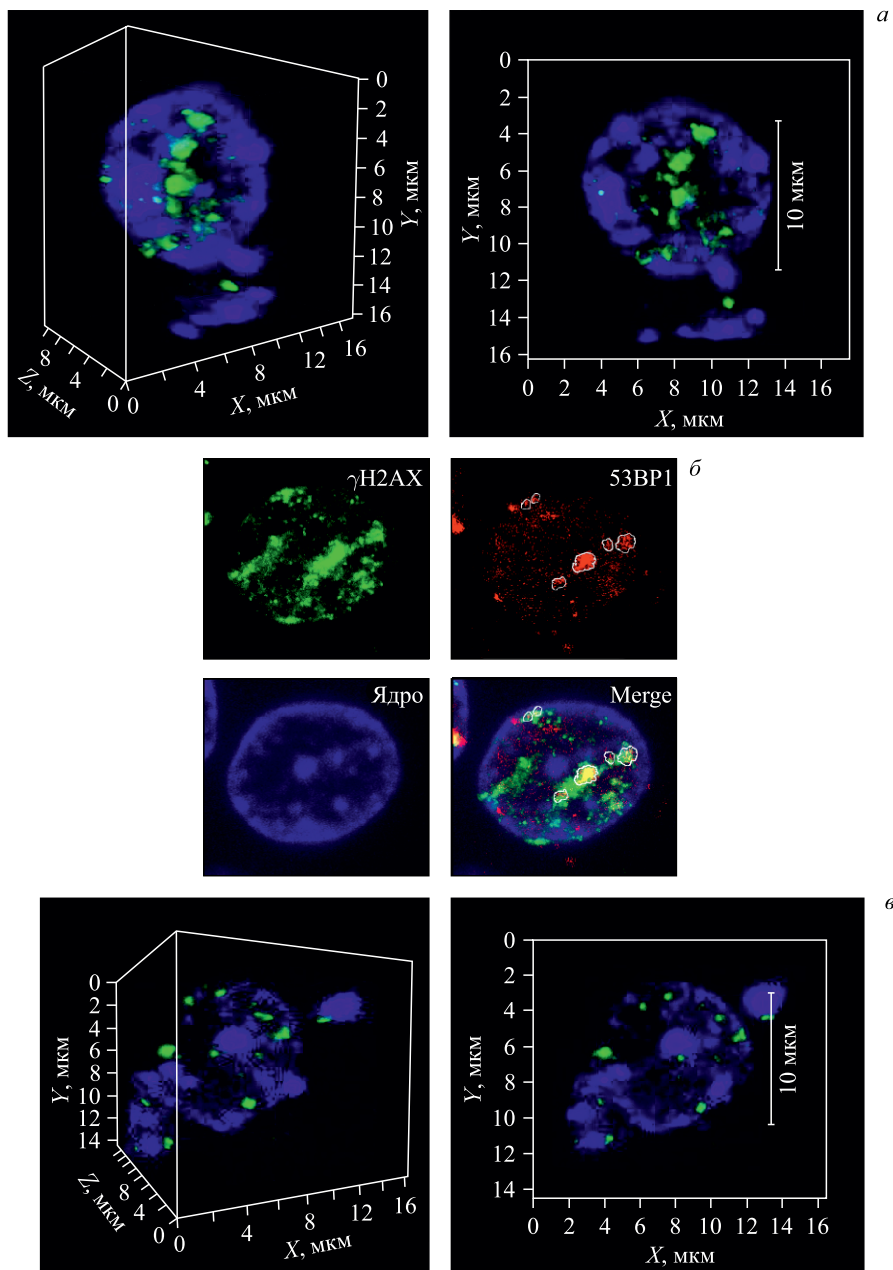


Рис. 5 (цветной в электронной версии). *а*) Визуализация трека иона ^{78}Kr в ядре клетки зубчатой фасции методом иммуногистохимического окрашивания. Зеленым показан сформированный ионом криптона трек γH2AX фокусов, синим — ядро и окрашенный хроматин (DAPI); *б*) визуализация трека в ядре клетки CA1 подобласти через 1 ч после облучения; *в*) визуализация РИФ в ядре клетки зубчатой фасции методом иммуногистохимического окрашивания при действии протонов 150 МэВ

Рис. 6. Схема расчета плотности распределения γ H2AX/53BP1 фокусов в визуализированном «треке» при прохождении иона $^{78}\text{Kг}$ в ядре клетки CA1 подобласти гиппокампа

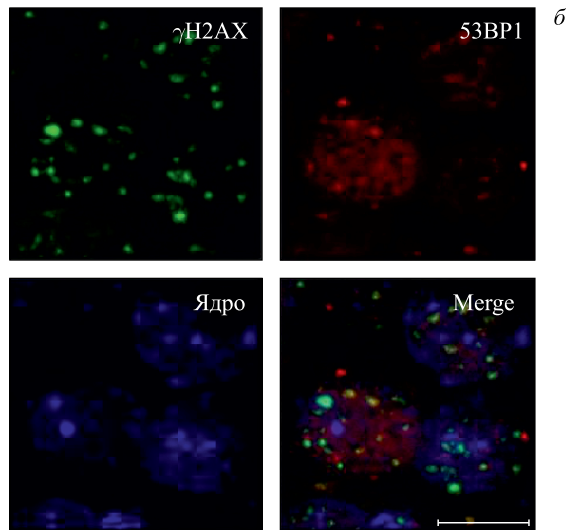
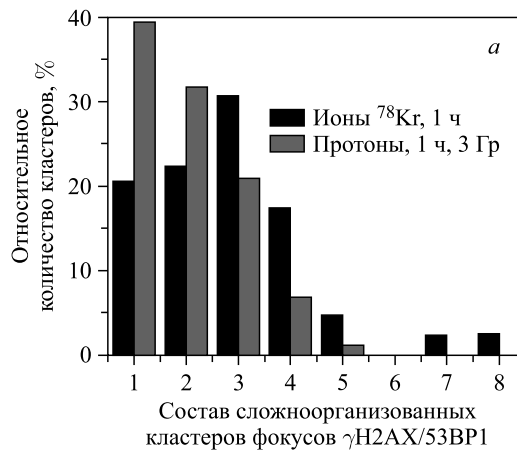
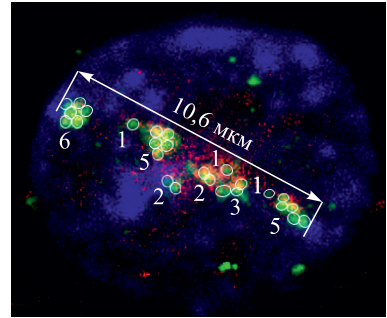


Рис. 7. а) Состав сложноорганизованных γ H2AX/53BP1 кластеров фокусов, формируемых через 1 ч после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ и протонами в дозе 3 Гр в клетках зубчатой фасции. б) Изображение ядра клетки зубчатой фасции после воздействия протонов в дозе 3 Гр (150 МэВ)

Подобные «трековые структуры» образуются вследствие последовательного расположения колокализированных $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов в одном выделенном направлении на общем поле гистологического среза. Представленные материалы свидетельствуют о том, что при действии ионов $^{78}\text{Kг}$ в ядрах клеток головного мозга облученных животных формируются плотные, хорошо различимые $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусы в виде «трековых структур». Большинство визуализированных «треков» пересекают одновременно несколько клеточных ядер, средняя длина «трека» в ядре составляет 9,6 мкм при диаметре клеточного ядра $\sim 11,7$ мкм. При этом большая часть фокусов ($\sim 75\%$) локализуется в сайтах по ходу сердцевины трека заряженных частиц. Следует заметить, что формирующиеся РИФ через 1 ч после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ имеют более сложную кластерную структуру по сравнению с изученными нами ранее [6] повреждениями, индуцируемыми протонами с энергией 150 МэВ (рис. 5, в).

На рис. 6 представлена схема расчета плотности распределения РИФ в визуализированном «треке». Плотность РИФ в «треке» определялась как соотношение количества подсчитанных в 3D-геометрии колокализированных $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов, расположенных в ядре клетки в одном направлении в непосредственной близости, к общей длине визуализированного «трека» частицы в ядре. При пересечении частицей одновременно нескольких клеточных ядер длина «трека» частицы оценивалась для каждой клетки в отдельности. Плотность РИФ в «треке», представленном на рис. 6, составляет 2,45 РИФ/мкм. Средняя плотность РИФ в «трековых областях» нейронов CA1 подобласти составляет 0,7 РИФ/мкм. Единичные фокусы располагаются на периферии выделенной трековой структуры РИФ.

На рис. 7, а показан состав формируемых сложноорганизованных $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ кластеров через 1 ч после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ и протонами в дозе 3 Гр в клетках зубчатой фасции. Выявлено, что ионы $^{78}\text{Kг}$ через 1 ч формируют сложные кластеры РИФ, состоящие из нескольких индивидуальных РИФ. Для тяжелых ионов их количество достигает 7–8, что не отмечается при облучении протонами.

На рис. 8, а, б представлен состав сложноорганизованных $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ кластеров в различное время после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ в клетках зубчатой фасции и CA1 подобласти гиппокампальной формации. Через 1 и 4 ч после радиационного воздействия большинство фокусов состоит из 2–4 близкорасположенных индивидуальных фокусов. Снижение сложности формируемых РИФ происходит только к 24 ч после облучения. К этому времени в клетках зубчатой фасции остаются только единичные РИФ, состоящие из двух индивидуальных фокусов в CA1 подобласти гиппокампа.

На рис. 9 представлена кинетика формирования и элиминации $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ в клетках зубчатой фасции и CA1 подобласти гиппокампальной формации. Максимальное количество РИФ в клетках CA1 подобласти наблюдается через 1 ч после облучения. Через 4 ч после облучения происходит некоторое снижение количества РИФ. Однако статистически значимые различия в количестве РИФ через 1 и 4 ч после облучения отсутствуют. К 24 ч после облучения остается некоторое количество клеток, содержащих отдельные крупные РИФ. В клетках зубчатой фасции максимальное количество РИФ наблюдается через 4 ч после облучения. Визуализация количественных и морфологических изменений формирования и элиминации $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ фокусов в CA1 подобласти и зубчатой фасции гиппокампальной формации продемонстрированы на рис. 10 и 11 соответственно.

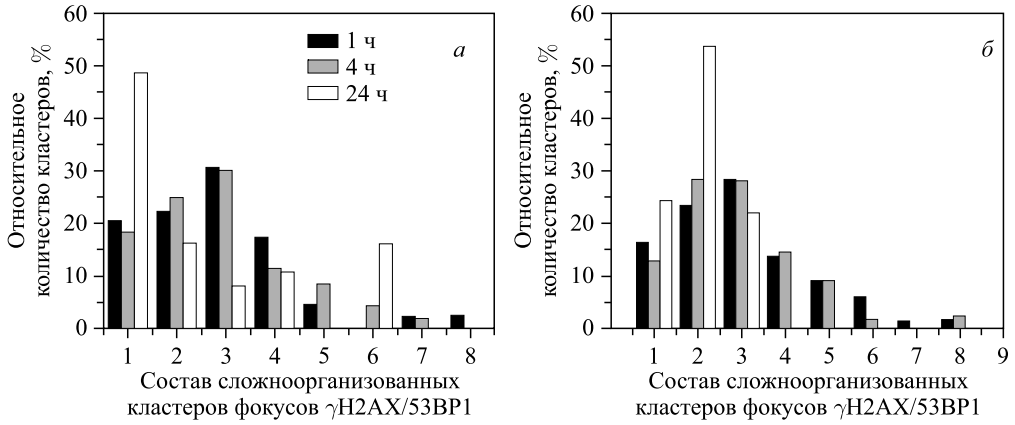


Рис. 8. Состав сложноорганизованных γ H2AX/53BP1 кластеров фокусов после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ в клетках зубчатой фасции (a) и CA1 подобласти (б) гиппокампальной формации. По оси абсцисс отложено количество индивидуальных фокусов, входящих в сложноорганизованный γ H2AX/53BP1 кластер, по оси ординат — относительное количество кластеров определенной сложности от всего объема проанализированных γ H2AX/53BP1 фокусов в 3D-геометрии

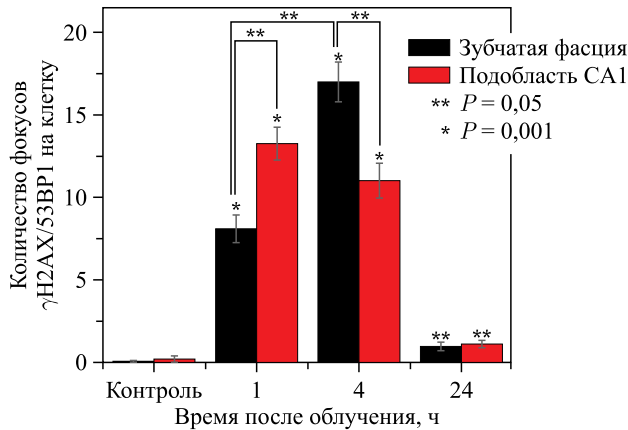


Рис. 9. Кинетика формирования и элиминации γ H2AX/53BP1 фокусов после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ в клетках зубчатой фасции и CA1 подобласти гиппокампальной формации. Представлено среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Статистически достоверная разница между количеством γ H2AX/53BP1 фокусов в CA1 подобласти и зубчатой фасции гиппокампальной формации наблюдается через 1 и 4 ч после облучения, $P = 0,05$ (тест Манна–Уитни). Статистически достоверная разница в количестве γ H2AX/53BP1 фокусов наблюдается между 1 и 4 ч после облучения зубчатой фасции. Статистически значимые различия в сравнении с необлученным контролем наблюдаются через 1 и 4 ч при $P = 0,001$, через 24 ч — $P = 0,05$ (тест Манна–Уитни)

Полученные материалы свидетельствуют о том, что прохождение ТЗЧ релятивистских энергий через генетические структуры клетки влечет за собой формирование повреждений с высокой степенью кластеризации. Как уже указывалось выше (см. рис. 5, a),

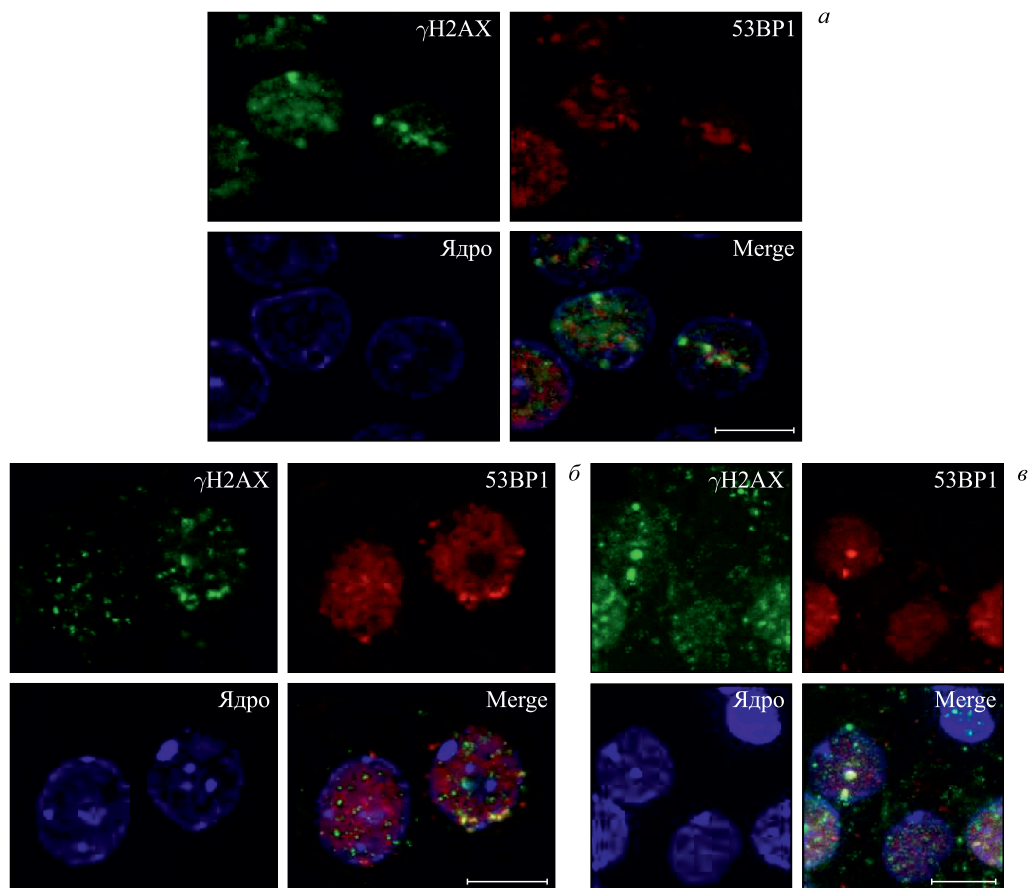


Рис. 10. Формирование и элиминация γ H2AX/53BP1 фокусов после облучения ионами ^{78}Kb в клетках гиппокампа CA1 области через 1 ч (а), 4 ч (б), 24 ч (в)

характер распределения радиационно-индуцированных фокусов спустя 1 ч после облучения представляется в виде «треков», пересекающих облучаемые области мозга. Следует заметить, что в этом случае выявляются и неколокализованные сайты γ H2AX и 53BP1 фокусов; лишь наиболее крупные γ H2AX фокусы имеют колокализацию с 53BP1 сайтами. Это может быть обусловлено либо недостаточным количеством 53BP1 белка через 1 ч после радиационного воздействия, либо недоступностью сайтов повреждений для 53BP1. Через 4 ч после облучения в клетках также выявляются фокусы γ H2AX/53BP1 в виде «треков», но уже с более низкой плотностью распределения РИФ в «треках» по сравнению с первым часом после радиационного воздействия, что хорошо видно на рис. 10, б и 11, б. Наблюдается увеличение площади колокализованных РИФ и отсутствие неколокализованных γ H2AX фокусов. К 24 ч после облучения большинство ядер клеток в CA1 подобласти и зубчатой фасции не содержат фокусы в виде «треков», однако сохраняется небольшое количество клеток, содержащих крупные единичные фокусы (рис. 10, в и 11, в).

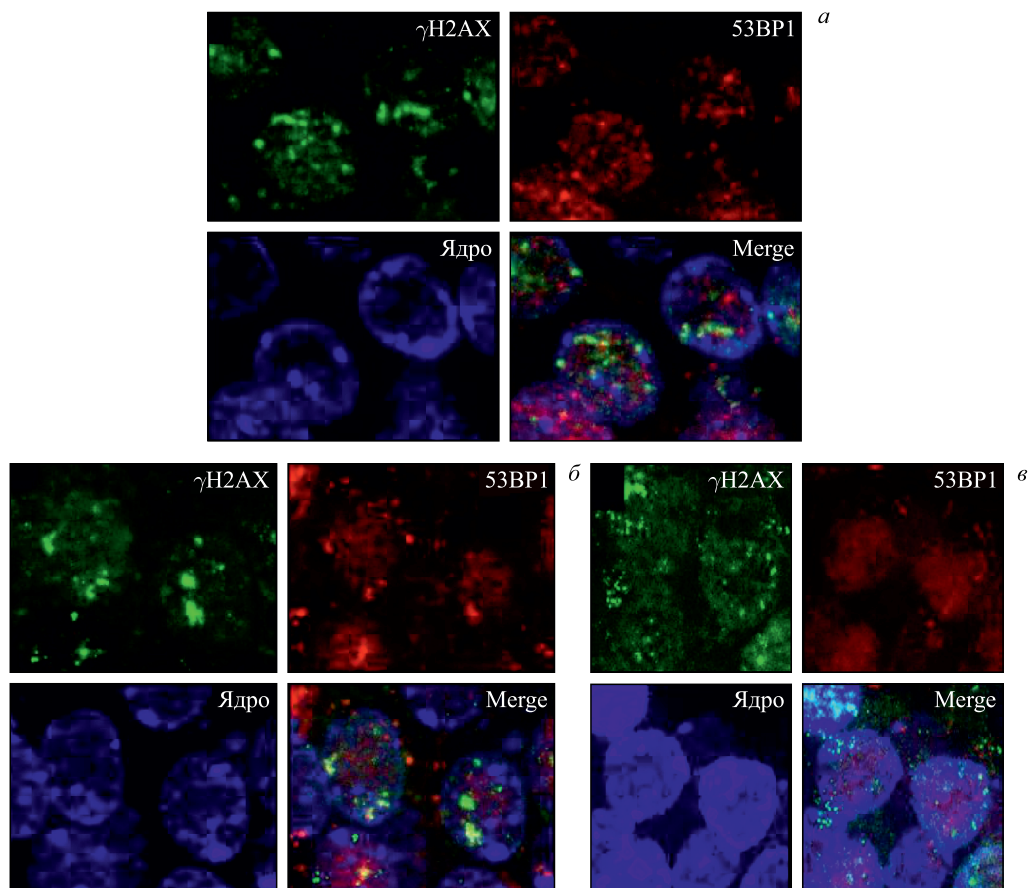


Рис. 11. Формирование и элиминация γ H2AX/53BP1 фокусов после облучения ионами ^{78}Kr в клетках зубчатой фасции гиппокампальной формации через 1 ч (а), 4 ч (б), 24 ч (в)

Таким образом, отличительной чертой действия тяжелых заряженных частиц на генетические структуры клеток центральной нервной системы животных при облучении *in vivo*, так же как и при облучении культуры клеток *in vitro*, является формирование кластерных двунитевых разрывов ДНК — наиболее тяжелых генетических нарушений, не характерных для электромагнитных видов излучений. Это обстоятельство во многом обуславливает высокую биологическую эффективность тяжелых заряженных частиц по различным критериям радиационного воздействия: летальным эффектам, трансформации нормальных клеток в злокачественные, формированию различного типа хромосомных aberrаций. Анализ молекулярных нарушений, лежащих в основе действия ТЗЧ, указывает в этом случае на решающую роль кластерных повреждений ДНК в инициации патологических изменений. Полученные нами материалы, касающиеся особенностей формирования и элиминации кластерных повреждений ДНК в структурах центральной нервной системы грызунов при облучении тяжелыми ядрами криптона релятивистских энергий, дают представление о характере тяжести генетических нарушений в нейро-

нах головного мозга облученных животных. Степень кластеризации регистрируемых РИФ достигает значительных величин. В индивидуальный РИФ сложноорганизованного γ H2AX/53BP1 фокуса после облучения ионами $^{78}\text{Kг}$ в клетках различных областей гиппокампа может входить до 9 и более отдельных фокусов, отражающих формирование двунитевых разрывов ДНК. Такие повреждения длительное время остаются нерепарированными и, по-видимому, в значительной мере определяют специфику проявлений нейрорадиобиологических эффектов, включающих нарушения высших интегративных функций у животных в поздние сроки после облучения тяжелыми заряженными частицами.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант офи-м № 17-29-01007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jezkova L., Zadneprianetc M. G., Kulikova E. A., Smirnova E. V., Bulanova T., Depes D., Falkova I., Boreyko A. V., Krasavin E. A., Davidkova M., Kozubek S., Valentova O., Falk M. Particles with Similar LET Values Generate DNA Breaks of Different Complexity and Reparability: A High-Resolution Microscopy Analysis of γ H2AX/53BP1 Foci // *Nanoscale*. 2018. V. 10. P. 1162–1179.
2. Заднепрянец М. Г., Борейко А. В., Буланова Т. С., Йежкова Л., Красавин Е. А., Куликова Е. А., Смирнова Е. В., Фальк М., Фалькова И. Закономерности формирования и элиминации γ H2AX/53BP1-фокусов при действии γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2018. Т. 58, № 2. С. 146–156.
3. Заднепрянец М. Г., Борейко А. В., Буланова Т. С., Йежкова Л., Красавин Е. А., Куликова Е. А., Смирнова Е. В., Фальк М., Фалькова И. Анализ структуры комплексных повреждений ДНК при действии ускоренных ионов $^{11}\text{В}$ и γ -квантов $^{60}\text{Со}$ // Там же. № 3. С. 229–237.
4. Zadneprianetc M. G., Boreyko A. V., Bulanova T. S., Jezkova L., Krasavin E. A., Kulikova E. A., Smirnova E. V. The Influence of Physical Characteristics of Accelerated Heavy Ions on the Formation and Repair of DNA Double-Strand Breaks // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2018. V. 15, No. 6. P. 693–699.
5. Britten R. A., Davis L. K., Johnson A. M., Keeney S., Siegel A., Sanford L. D., Singletary S. J., Lonart G. Low (20 cGy) Doses of 1 GeV/U ^{56}Fe -Particle Radiation Lead to a Persistent Reduction in the Spatial Learning Ability of Rats // *Rad. Res.* 2012. V. 177. P. 146–151.
6. Boreyko A. V., Bugay A. N., Bulanova T. S., Dushanov E. B., Jezkova L., Kulikova E. A., Smirnova E. V., Zadneprianetc M. G., Krasavin E. A. Clustered DNA Double-Strand Breaks and Neuroradiobiological Effects of Accelerated Charged Particles // *Phys. Part. Nucl. Lett.* 2018. V. 15, No. 5. P. 551–561.
7. Бонь Е. И., Зиматкин С. М. Строение и развитие гиппокампа крысы // *Журн. Гродн. гос. мед. ун-та*. 2018. Т. 16, № 2. С. 132–138.
8. Incerti S., Kyriakou I., Bernal M. A., Bordage M. C., Francis Z., Guatelli S., Ivanchenko V., Karamitros M., Lampe N., Lee S. B., Meylan S., Min C. H., Shin W. G., Nieminen P., Sakata D., Tang N., Villagrasa C., Tran H. N., Brown J. M. C. Geant4-DNA Example Applications for Track Structure Simulations in Liquid Water: A Report from the Geant4-DNA Project // *Med. Phys.* 2018. V. 45. P. 722–739.