

© А.А. Беленко¹,
С.А. Васильев^{1,2},
И.Н. Лебедев^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» РАН, Томск

Генотоксическое действие ионизирующего излучения в ранний период эмбрионального развития может привести к фатальным последствиям. В то же время проблема радиочувствительности эмбриональных и экстраэмбриональных дифференцированных клеток зародышей человека остается слабо исследованной. В настоящей работе проведен анализ эффективности системы репарации двунитевых разрывов ДНК экстраэмбриональных фибробластов зародышей человека. Показано, что в экстраэмбриональных фибробластах способность к репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК, вероятно, отражает потенциал репарации спонтанных двунитевых разрывов ДНК.

✳ **Ключевые слова:** фокусы γ H2AX; микроядра; двунитевые разрывы ДНК; репарация ДНК; экстраэмбриональные фибробласты; индивидуальная радиочувствительность.

МАРКЕРЫ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЭКСТРАЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕЙ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

ВВЕДЕНИЕ

Способность к репарации повреждений ДНК является специфичной для каждого типа клеток и определяет их индивидуальную чувствительность к действию различных мутагенов, в том числе ионизирующему излучению. Процесс репарации ДНК во время внутриутробного развития остается мало изученным вопросом (Pachkowski et al., 2011). В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК и анализ особенностей чувствительности первичных экстраэмбриональных фибробластов человека к действию ионизирующего излучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 18 первичных линий экстраэмбриональных фибробластов человека, выделенных из плодного мешка медицинских абортусов. Забор материала осуществляли на основе информированного согласия женщин. Культивирование клеток проводили по стандартной методике (Rooney, Czepulkowski, 1992) с небольшими изменениями. Облучение материала в дозе 1 Гр проводили с использованием гамма-терапевтического аппарата Theratron Equinox на базе клиники НИИ онкологии (г. Томск). Оценку уровня двунитевых разрывов ДНК проводили путем анализа числа фокусов гистона γ H2AX. Для иммуноокрашивания были использованы первичные моноклональные мышинные антитела к белку γ H2AX и вторичные кроличьи антитела с родамином (Novus, США), разведенные в 3 % FBS в концентрации 1 : 500. Окрашивание ядер проводили DAPI (0,3 мкМ) (Sigma, США), для защиты от выцветания на окрашенный препарат наносили среду Vectashield (Vector Labs, США). Частоту образования центромеронегативных микроядер, возникающих из хромосомного материала с нерепарированными двунитевыми разрывами ДНК, оценивали с помощью микроядерного теста в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH) с панцентромерными ДНК-зондами по стандартной методике (Fenech, 2007). Анализ всех препаратов осуществляли на микроскопе Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с применением системы Metafer (Metasystems, Германия). Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Манна–Уитни в программном пакете Statistica 6.0 (Statsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота фокусов γ H2AX в контроле варьировала от 0,56 до 1,93 фокуса на клетку и в среднем составляла $1,01 \pm 1,42$ фокус/клетку. Через 30 минут после облучения частота фокусов γ H2AX значительно возрастала до $10,21 \pm 5,17$ фокуса/клетку ($p = 0,0006$) с последующим снижением через 24 часа после облучения до уровня, не отличающегося

Поступила в редакцию 19.04.2015
Принята к публикации 07.12.2015

значимо от контрольного ($0,77 \pm 0,36$ фокуса/клетку). Эффективность репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК в среднем составляла 97 %. Эффективность репарации была оценена в части линий ($n = 9$) как доля радиационно-индуцированных фокусов γH2AX , исчезнувших с 30 мин до 24 часов после облучения. Частота центромеронегативных микроядер значимо повышалась с $3,86 \pm 2,12$ % в контроле до $45,33 \pm 19,23$ % после облучения ($p = 0,000\,002$).

Важным вопросом является поиск маркеров индивидуальной радиочувствительности клеток человека, в качестве одного из которых рассматривается эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК. Однако в настоящей работе не было выявлено значимой корреляции между уровнем фокусов γH2AX через 24 часа после облучения, являющихся маркером нерепарированных двунитевых разрывов ДНК, и частотой радиационно-индуцированных микроядер. Ранее мы обнаружили, что в лимфоцитах периферической крови взрослых индивидов маркером индивидуальной радиочувствительности может являться спонтанный уровень фокусов γH2AX (Melnikov et al., 2013). Однако в настоящей работе не было выявлено значимой корреляции между фоновым и радиационно-индуцированным уровнем фокусов γH2AX и радиационно-индуцированной частотой центромеронегативных микроядер. Возможно, это свидетельствует о специфичности клеточного ответа лимфоцитов и экстраэмбриональных фибробластов на действие радиации. С другой стороны, частота центромеронегативных микроядер, индуцированных радиацией, зависит от спонтанной частоты центромеронегативных микроядер до облучения ($R = 0,52$, $p = 0,038$). Вероятно, в экстраэмбриональных фибробластах человека способность к репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК отражает также потенциал репарации двунитевых разрывов ДНК, вызванных действием фоновых факторов. В соматических клетках взрослого организма эффективность репарации ДНК и радиочувствительность зависят от различных параметров, включая возраст индивида. Однако в экстраэмбриональных фибробластах человека не было обнаружено влияния срока беременности женщин, на котором было проведено прерывание беременности, на уровень фокусов γH2AX и микроядер, что указывает на отсутствие вклада данного фактора в изучаемый феномен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые исследована связь между спонтанным уровнем фокусов γH2AX и частотой радиационно-индуцированных цитогенетических повреждений в экстраэмбриональных фибробластах человека. Срав-

нительный анализ зависимости реализации негативных эффектов излучения от активности системы репарации ДНК показал, что способность к репарации спонтанных двунитевых разрывов ДНК в фибробластах отражает также потенциал репарации радиационно-индуцированных повреждений.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-31867 и стипендии Президента № СП-364.2015.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fenech M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. V. 2. P. 1084–1104.
2. Human Cytogenetics: A Practical Approach (1992) edited by D. E. Rooney, B. H. Czepulkowski. Oxford; New York: IRL Press, 320 p.
3. Melnikov A. A., Vasilyev S. A., Musabaeva L. I., Velikaya V. V., Gribova O. V., Urazova L. N., Lebedev I. N., Choznzonov E. L. (2013) Frequency and spectrum of chromosome aberrations and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck tumors and relapse of breast cancer during the course of neutron therapy. *European Journal of Human Genetics*. V. 21, Suppl. 2. P. 300.
4. Pachkowski B. F., Guyton K. Z., Sonawane B. (2011) DNA repair during in utero development: A review of the current state of knowledge, research needs, and potential application in risk assessment. *Mutation Research*. V. 728. P. 35–46.

MARKERS OF HUMAN EXTRAEMBRYONAL CELLS INDIVIDUAL RADIOSENSITIVITY IN VITRO

Belenko A. A., Vasilyev S. A., Lebedev I. N.

✳ **SUMMARY:** *Background:* Genotoxic effects of ionizing radiation in early stages of human embryonic development can lead to fatal consequences. At the same time, the radiosensitivity of human embryonic and extraembryonic cells is still poorly studied. In this study, the analysis of DNA double-strand break repair effectiveness in human extraembryonal fibroblasts was carried out. *Materials and methods.* Extraembryonic human fibroblasts was irradiated by 1 Gy gamma-rays using Theratron Equinox (Cancer Research Institute, Tomsk). The level of DNA double strand breaks was assessed using γH2AX foci. Frequency of cytogenetic damage was assessed using micronucleus test conducted with FISH as a frequency of centromere-negative micronuclei. *Results.* No significant correlation was observed between both endogenous and residual levels of radiation-induced γH2AX foci and frequency of micronuclei after irradiation. It is suggested to be a result of the specificity of extraembryonal fibroblast radiation-induced response. The spontaneous frequency of centromere-negative micronuclei correlated with radiation-induced frequency of centromere-negative micronuclei. *Conclusion.* It was shown that human extraembryonal fibroblasts ability to repair radiation-induced DNA

damage is likely to be reflected by the repair of spontaneous DNA double strand breaks.

✿ **KEYWORDS:** γ H2AX foci; micronuclei; DNA double-strand breaks; DNA repair; extraembryonic fibroblasts; individual radiosensitivity.

✿ Информация об авторах

Беленко Андрей Александрович — аспирант, кафедра физиологии человека и животных. ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет». 634050, Томск, пр. Ленина, д. 36. E-mail: greyden@sibmail.com.

Васильев Станислав Анатольевич — научный сотрудник, лаборатория цитогенетики. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» РАН. 634050, Томск, набережная реки Ушайки, д. 10. E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru.

Лебедев Игорь Николаевич — руководитель лаборатории цитогенетики. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» РАН. 634050, Томск, набережная реки Ушайки, д. 10. E-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru.

Belenko Andrey Alexandrovich — PhD Student, Department of Human and Animal Physiology. National Research Tomsk State University. 634050, Tomsk, prospekt Lenina, 35, Russia. E-mail: greyden@sibmail.com.

Vasilyev Stanislav Anatolyevich — Research Fellow, Laboratory of cytogenetics. Research Institute of Medical Genetics, RAS. 634050, Tomsk, naberezhnaya reki Ushayki, 10, Russia. E-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru.

Vasilyev Stanislav Anatolyevich — Head of Laboratory, Laboratory of cytogenetics. Research Institute of Medical Genetics, RAS. 634050, Tomsk, naberezhnaya reki Ushayki, 10, Russia. E-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru.