

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 2(6)

2011 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в Перечень
научных изданий Респуб-
лики Беларусь для опубликова-
ния диссертационных иссле-
дований по медицинской и
биологической отраслям науки
(31.12.2009, протокол 25/1)

Журнал зарегистрирован

Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Компьютерная верстка
А.А. Гурин

Подписано в печать 22.09.11.
Формат 60×90/8. Бумага офсетная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 155 экз.
Усл. печ. л. 16,75. Уч.-изд. л. 11,9.
Зак. 938.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и экологии
человека»
ЛИ № 0230/0131895 от 3.01.2007 г.

Отпечатано в Филиале БОРБИЦ
РНИУП «Институт радиологии».
220112, г. Минск,
ул. Шпилевского, 59, помещение 7Н

ISSN 2074-2088

Главный редактор

В.П. Сытый (д.м.н., профессор)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Ю.В. Висенберг (к.б.н., отв. секретарь), Н.Г. Власова (к.б.н., доцент), А.В. Величко (к.м.н., доцент), В.М. Дорофеев (к.м.н., доцент), В.В. Евсеенко (к.п.с.н.), А.В. Коротаев А.В. (к.м.н.), Н.Б. Кривелевич (к.м.н.), А.Н. Лызилов (д.м.н., профессор), А.В. Макарович (к.м.н.), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), А.В. Рожко (к.м.н., доцент), Г.Н. Романов (к.м.н.), А.М. Скрябин (к.м.н.), А.Е. Силин (к.б.н.), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), О.В. Черныш (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н.), А.Н. Цуканов (к.м.н.)

Редакционный совет

С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), Ю.Е. Демидчик (д.м.н., член-корреспондент НАН РБ, Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), Я.Э. Кенигсберг (д.б.н., профессор, Минск), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Минск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), И.А. Новикова (д.м.н., профессор, Гомель), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), В.П. Ситников (д.м.н., профессор, Гомель), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), В.П. Филонов (д.м.н., профессор), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), А.Ф. Цыб (д.м.н., академик РАМН, Обнинск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции

246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.rcrm.by>
e-mail: mbpr@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр радиационной
медицины и экологии человека», 2011

№ 2(6)

2011

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© *Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology*

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- Ю.И. Ефремова, Л. Навратил
Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на продукцию цитокинов 6

Медико-биологические проблемы

- А.Е. Силин, В.Н. Мартинков, Э.А. Надыров, Е.В. Пестриков, О.М. Либуркин, А.А. Задорожнюк, Э.А. Повелица, С.М. Мартыненко, А.А. Силина, И.Б. Тропашко, А.В. Воропаева Статус метилирования промоторных областей 11 генов-супрессоров при злокачественном новообразовании предстательной железы 14

- А.М. Скрябин, Н.Н. Савва, Ю.А. Бельский, А.Н. Матарас Ретроспективная оценка уровня облучения детей в ранние сроки после чернобыльской аварии на примере реальных случаев врожденного лейкоза 20

- А.В. Тарасова, Т.В. Шман Определение репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови по накоплению фосфорилированной формы гистона H2AX 28

- В.В. Шевляков, В.А. Филонюк, Т.С. Студеничник, Г.И. Эрм, Н.А. Щурская, А.В. Буйницкая, Е.В. Чернышова, Т.В. Козловская Новый комплексный биологический препарат «Гулливер»: особенности вредного действия на организм 34

Клиническая медицина

- Т.В. Бобр Применение чрескожной электростимуляции в лечении частичной атрофии зрительного нерва сосудистого генеза 42

- А.В. Богданович, В.Н. Шиленок, Л.Н. Кирпиченок Энтеральная дезин-

Reviews and problem articles

- Yul. Efremova, L. Navrátil Effects of low level laser irradiation on cytokine production

Medical-biological problems

- A. Silin, V. Martinkov, E. Nadyrov, E. Pestrikov, O. Liburkin, A. Zadorozhnyuk, E. Povilitsa, S. Martynenko, A. Silina, I. Tropashko, A. Voropayeva DNA methylation status of promoter regions of 11 suppressor genes in malignant neoplasm of prostate

- A.M. Skryabin, N.N. Savva, Yu.A. Belsky, A.N. Mataras Retrospective population-based study of irradiation exposure in infant leukemia cases registered within the early period after Chernobyl accident (reconstruction of the individualized accumulated doses)

- A. Tarasova, T. Shman DNA double-strand breaks repair detection in lymphocytes based on histone H2AX phosphorylation

- V. Shevlaykov, V. Filanyuk, T. Studenichnik, G. Erm, N. Stchurskaya, A. Buinitskaya, E. Chernyshova, T. Kozlovskaya New complex biological product «Gulliver»: peculiar features of harmful effects on the organism

Clinical medicine

- T. Bobr Estimation of transcutaneous electrostimulation application in patients with partial optic nerve atrophy of vascular origin

- A.V. Bogdanovich, V.N. Shilenok, I.N. Kirpichenok Enteral dezintoxica-

токсикация в раннем послеоперационном периоде у больных острой спаечной кишечной непроходимостью	47	tion in early postoperative period in treatment patients with acute adhesive intestinal obstruction	
<i>Н.В. Галиновская, Н.Н. Усова, О.В. Лыщенко, Е.В. Иванашко, В.Я. Латышева</i> Особенности биохимического спектра у лиц с преходящими нарушениями мозгового кровообращения	53	<i>N.V. Galinovskaya, N.N. Usova, O.V. Lyshchenko, E.V. Ivanashko, V.Ja. Latysheva</i> Features of a biochemical spectrum in persons with transient ischaemic attack	
<i>В.И. Григорьев, С.А. Игумнов, И.В. Григорьева</i> Применение ароматихотерапии в системе реабилитации пациентов с артериальной гипертензией	59	<i>V. Grigoryev, S. Igumnov, I. Grigoryeva</i> Application of aromatherapy in rehabilitation of the patients suffering arterial hypertension	
<i>И.А. Давыдова, М.Г. Русаленко</i> Психоэмоциональное состояние и качество жизни пациентов с сахарным диабетом 1 типа	65	<i>I. Davydova, M. Rusalenko</i> Psychoemotional state and quality of life in patients with type 1 diabetes	
<i>И.Г. Деменкова, В.И. Ковалева</i> Генетическая характеристика детей, родители которых подверглись радиационному воздействию в детском и подростковом возрасте вследствие аварии на ЧАЭС	74	<i>I.G. Demenkova, V.I. Kovaleva</i> Genetic characteristic of children whose parents were subject to radiation impact in their childhood or at puberty as a result of the Chernobyl accident	
<i>Н.В. Николаева</i> Прогнозирование возникновения ИБС с помощью математической модели, построенной по результатам дискриминантного анализа	80	<i>N.V. Nikolaeva</i> Prediction of coronary heart disease using a mathematical model, constructed from the results discriminant analysis	
<i>В.М. Мицура</i> Оценка выраженности фиброза печени у пациентов с хроническим гепатитом С, роль непрямых маркеров фиброза	87	<i>V.M. Mitsura</i> Assessment of liver fibrosis extent in patients with chronic hepatitis C, role of indirect markers of liver fibrosis	
<i>Г.К. Молдабек</i> Влияние эмоционального фона на качество жизни у больных гипотиреозом	93	<i>G.K. Moldabek</i> Influence of an emotional background on quality of a life at patients with hypothyroidism	
<i>Г.Н. Романов, Н.Ф. Чернова, Э.В. Руденко</i> Факторы риска в развитии низкотравматичных переломов у пациентов с нарушением минеральной плотности костной ткани	98	<i>G.N. Romanov, N.F. Chernova, E.V. Rudenko</i> Risk factors in development of fragility fractures at patients with deficit of bone mineral density	
<i>Г.Н. Хованская, Т.А. Новицкая, Н.А. Филина</i> Практическая реализация методики медицинской реабили-		<i>G.N. Hovanskaya, T.A. Novitskaya, N.A. Filina</i> Practical realization of the technique of medical aftertreatment	

тации пациентов с периферическими невропатиями верхних и нижних конечностей	103	of patients with peripheric neuropathies of the upper and lower extremities
<i>Н.П. Шилова, И.А. Байкова, О.В.Курс</i> Психоэмоциональные особенности пациентов с рецидивирующим простым герпесом	108	<i>N.P. Shilova, I.A. Baikova, O.V. Kurs</i> Personal features of patients with recurrent herpes simplex
Обмен опытом		Experience exchange
<i>М.Г. Зубрицкий, М.К. Недзведь</i> Морфологическая диагностика герпетических инфекций при хроническом гастрите у взрослых	114	<i>M.G. Zubritsky, M.K. Nedzvedz</i> Morphological diagnostics of the herpetic infections at chronic gastritis in adults
<i>А.В. Рожко, В.Б. Масыкин, Э.А. Надыров, А.В. Башилов, В.К. Иванов, М.А. Максютков</i> История создания, структура и функции Единого чернобыльского регистра России и Беларуси	122	<i>A.V. Rozhko, V.B. Masyakin, E.A. Nadyrov, A.V. Bashylau, V.K. Ivanov, M.A. Maksutov</i> History of creation, structure and functions of the Common Chernobyl Register of Russia and Belarus

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПО НАКОПЛЕНИЮ ФОСФОРИЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ ГИСТОНА H2AX

ГУ «РНПЦ детской онкологии и гематологии», г. Минск, Беларусь

Определение радиочувствительности лимфоцитов крови часто используется как дополнительный тест при диагностике синдромов хромосомной нестабильности, так как гетерогенная природа подобных заболеваний не всегда позволяет поставить точный диагноз на основе только цитогенетических тестов. В результате проведенных исследований был разработан метод оценки репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови с использованием проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. Было установлено, что после воздействия на лимфоциты ионизирующего излучения дозой 5 Гр можно оценить степень повреждения ДНК и эффективность репаративного ответа клеток, используя фосфорилированный гистон γ H2AX как специфический маркер двунитевых разрывов ДНК.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, двунитевые разрывы ДНК, гистон γ H2AX, синдром хромосомной нестабильности

Введение

Эффективная репарация ДНК необходима для сохранения целостности генома клеток и предотвращения накопления мутаций, ведущих к онкотрансформации. Нарушения в детекции повреждений ДНК, их репарации или запуске программы апоптоза приводит ко многим наследственным заболеваниям, характеризующимся хромосомной нестабильностью, иммунодефицитным состоянием и предрасположенностью к онкологическим заболеваниям (Анемия Фанкони, Синдром Ниймегена, Синдром Луи-Бар и др.).

На современном этапе развития медицинской науки молекулярная цитогенетика имеет уникальные возможности в диагностике и мониторинге мутационных изменений. Однако недостаточная специфичность и чувствительность цитогенетических методов не всегда позволяет провести точную диагностику перечисленных выше заболеваний. К недостаткам данных методов также относятся длительность их проведения и необходимость большого объема исследуемого материала. Многие пациенты с синдромами хромосомной нестабильности не

имеют «характерного» внешнего вида, что может затруднить диагностику заболевания у пациентов с отсутствием врожденных пороков развития, минорными аномалиями, а также пограничными значениями тестов на ломкость с митомицином С/диэпоксиданом (ДЭБ) и теста на накопление клеток в G2 фазе. В качестве дополнительного диагностического теста часто используют также определение чувствительности лимфоцитов крови и/или фибробластов кожи к ионизирующему и УФ излучению (однако результаты исследований в этой области остаются противоречивыми) [1-2]. Поэтому существует необходимость в разработке дополнительных диагностических тестов для пациентов с данными заболеваниями.

Основываясь на том, что такие заболевания, как анемия Фанкони, синдром Ниймегена и Луи-Бар характеризуются дефектами белков, задействованных в репарации двунитевых разрывов ДНК, был предложен новый метод для диагностики этих заболеваний – определение фосфорилированного гистона в ответ на ионизирующее (γ) излучение [3]. Тест основан на выявлении двунитевых разрывов ДНК по фосфорили-

рованной форме гистона H2AX (γ H2AX) методом проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. Фосфорилирование H2AX является первой ступенью в репарации двуниевых разрывов ДНК. На расстоянии около 1 Мб по обе стороны от разрыва фосфорилируется множество молекул H2AX, что может быть визуализировано с помощью специфических к γ H2AX антител как отдельные фокусы в ядре клетки. Каждый фокус соответствует индивидуальному двуниевому разрыву ДНК. В течение 3 мин после ионизирующего облучения в клетках уже можно обнаружить γ H2AX фокусы, количество которых достигает максимального значения через 30-60 мин и уменьшается в течение нескольких часов, если разрывы репарируются [4]. Таким образом, определение количества фокусов γ H2AX позволяет определять ответ клеток на различные ДНК-повреждающие факторы (ионизирующее излучение, химиопрепараты) и проследить динамику сшивания двуниевых разрывов во времени.

А. Leskovas и соавт. предложили использовать мониторинг кинетики репарации двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови и/или фибробластах кожи как быстрый тест на выявление анемии Фанкони среди группы пациентов с недостаточностью кроветворения. Специфическим маркером двуниевых разрывов ДНК использовался γ H2AX. Исследователи показали, что после воздействия ионизирующего излучения на клетки пациентов с анемией Фанкони репарация двуниевых разрывов ДНК в них происходит значительно медленнее, чем в клетках здоровых доноров и других пациентов с недостаточностью кроветворения [5].

Другая группа исследователей (Р. Porcedda, 2006) оценивала кинетику репарации двуниевых разрывов ДНК после ионизирующего облучения в клетках пациентов с синдромом Луи-Бар и синдромом Ниймегена. В результате было выявлено, что в клетках пациентов с Луи-Бар спустя 72 часа сохраняется большее количество двуниевых разрывов по сравнению с клетками здоровых

доноров. В клетках пациента с синдромом Ниймегена наблюдалось промежуточное значение «несшитых» двуниевых разрывов ДНК. Основываясь на том, что гистон H2AX является непосредственной мишенью киназы АТМ (ataxia-telangiectasia-mutated), в последующих исследованиях данная группа ученых предложила использовать анализ уровня γ H2AX до и спустя 1 час после ионизирующего облучения дозой 2 Гр в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с Луи-Бар методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что средняя интенсивность флуоресценции γ H2AX в клетках пациентов с Луи-Бар спустя 1 час после облучения значительно ниже, чем в клетках здоровых доноров [6].

Цель: Изучить репаративный ответ лимфоцитов крови на ионизирующее излучение по уровню накопления гистона γ H2AX и выявить оптимальные условия, при которых оценка данного параметра может быть использована в качестве дополнительного диагностического теста для детей с синдромами повышенной хромосомной ломкости.

Материал и методы исследования

Объект исследования

В работе использованы лимфоциты периферической крови 2 пациентов с анемией Фанкони и 12 здоровых доноров, проходящих обследование в ГУ РНПЦДОГ. В ходе исследования доноров разделили на 4 группы: 1) лимфоциты доноров №1-3 облучали дозой 30 Гр, 2) лимфоциты доноров №4-6 облучали дозой 10 Гр, 3) лимфоциты доноров №7-9 облучали дозой 5 Гр, 4) лимфоциты доноров №10-12 облучали дозой 5 Гр и использовали для приготовления слайдов.

Выделение клеток и условия культивирования

Мононуклеарная фракция выделялась в градиенте плотности Histopaque-1077 путем центрифугирования при 1800 оборотах/мин при комнатной температуре. Выделенные клетки облучали дозой 5, 10 или 30 Гр и культивировали в 4-х-луночных плашках в среде RPMI-1640 в присутствии 10% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС), 2мМ

глутамин, смеси антибиотиков при 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов. Через 30 минут и 24 часа после облучения часть клеток отбирали для последующего анализа уровня γ H2AX и определения жизнеспособности.

Определение жизнеспособности клеток

Отбирали по 20 тыс. клеток из каждой лунки, отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS) и добавляли пропидиум йодид в конечной концентрации 5 мкг/мл. Образцы немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре FACSscan. Клетки, слабо накапливающие пропидиум йодид (отрицательные), считали живыми, а активно накапливающие (положительные) – погибшими.

Определение двунитевых разрывов ДНК по образованию фосфорилированной формы гистона H2AX методом проточной цитофлуориметрии

Клетки отмывали в PBS и фиксировали с помощью 1% раствора параформальдегида (15 мин, +4°C) и ледяного 70% этанола (не менее 20 часов). После чего дважды отмывали в PBS, ресуспензировали в блокирующем буфере (4% ЭТС в PBS) и инкубировали 2 часа с антифосфо-гистон-H2AX (Ser139) mouse IgG1к антителами в разведении 1:4000. Затем клетки отмывали в PBS с 4% ЭТС, добавляли вторичные антитела: Goat Anti-Mouse-IgG1(γ 1) Alexa Fluor488 (1:4000) и инкубировали 1 час при температуре +4°C [7]. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter). По прямому и боковому светорассеянию клеток из всей популяции выделяли регион, соответствующий группе лимфоцитов и анализировали его на количество клеток, экспрессирующих γ H2AX (по интенсивности флуоресценции в области 500-540 нм).

Определение двунитевых разрывов ДНК по образованию фосфорилированной формы гистона H2AX методом конфокальной микроскопии

Клетки отмывали в PBS, ресуспензировали в небольшом объеме (100-200 мкл) и с помощью цитоцентрифуги готовили слайды. Слайды помещали в 4% параформаль-

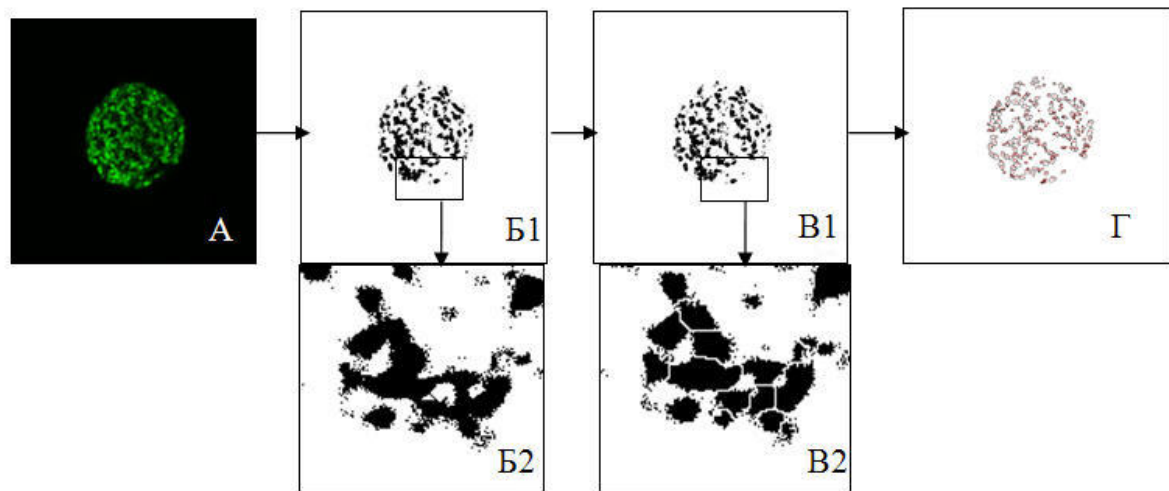
дегид (15 мин, +4°C) и ледяной 70% этанол (не менее 20 часов). Для удаления фиксирующего раствора из образцов слайды помещали на 30 мин в PBS, затем инкубировали 2 часа с антифосфо-гистон-H2AX (Ser139) mouse IgG1к антителами в разведении 1:1000. Отмывали слайды 2 раза по 10 мин в PBS, инкубировали с Goat Anti-Mouse-IgG1(γ 1) Alexa Fluor488 (1:1000), 3 раза отмывали в PBS по 10 мин, просушивали и помещали в среду для хранения, состоящую из глицерина и PBS. Анализ проводили на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE. Для каждого образца анализировали не менее 100 ядер [7]. Изображения обрабатывали в программе ImageJ. Количество фокусов на клетку рассчитывали с помощью функции автоматического подсчета частиц, предварительно отформатировав изображение (рисунок 1). При использовании функции анализа частиц программа рассчитывает количество частиц на клетку, их средний размер (в пикселах), общую площадь частиц и др. параметры.

Статистическая обработка результатов

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel 2003. Среднее значение \pm стандартная ошибка среднего рассчитывалась при $N \geq 3$.

Результаты исследования

Для оценки повреждения и репарации ДНК в клетках по уровню γ H2AX были использованы методы проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. Метод проточной цитофлуориметрии позволяет оценивать большое количество клеток, использовать многоцветное иммуноцитохимическое окрашивание нескольких клеточных маркеров, а также параллельно проводить анализ клеточного цикла. Однако, зачастую данный метод нецелесообразно использовать из-за недостаточной клеточности исследуемого материала, что особенно важно для пациентов с синдромами хромосомной нестабильности, характеризующихся иммунодефицитным со-



А – необработанное изображение с разрешением 1024*1024 пикселей; Б1 – бинарное (черно-белое) изображение с установленным уровнем «объект/фон» (threshold segmentation); Б2 – увеличенный фрагмент бинарного изображения, показывающий частично перекрывающиеся зоны; В1 – бинарное изображение с применением функции «разделения частиц» (watershed segmentation); В2 – увеличенный фрагмент бинарного изображения после «разделения частиц»; Г – подсчет частиц заданного размера (20-500 пикселей)

Рисунок 1 – Автоматический подсчет γ H2AX фокусов в лимфоците крови с помощью программы ImageJ

стоянием. В подобных случаях возможно использовать метод конфокальной микроскопии, который также позволяет проводить параллельное окрашивание и анализ нескольких клеточных маркеров, и, кроме того, выявлять отдельные γ H2AX фокусы и исключать из анализа неспецифически окрашенные объекты на поверхности или в цитоплазме клеток.

Используя метод проточной цитофлуориметрии, оценили степень повреждения ДНК через 30 мин/24 часа и выживаемость клеток через 24 часа после воздействия на них различных доз ионизирующего излучения – 5, 10 и 30 Гр. Для исследования ответа клеток на каждую дозу излучения было протестировано по 3 донора. Через 30 мин после ионизирующего облучения наблюдали увеличение уровня γ H2AX в клетках. Так, в контрольных клетках (необлученные) уровень γ H2AX составил от $3,1 \pm 1,5\%$ ($N=9$, доноры №1-9), в облученных дозой 30 Гр – $90,8 \pm 1,5\%$ ($N=3$, доноры №1-3), в облученных 10 Гр – $78,01 \pm 5,66\%$ ($N=3$, доноры №4-6) и в облученных 5 Гр – $64,2 \pm 5,5\%$ ($N=3$, доноры №7-9). Через 24 часа после облучения уровень γ H2AX в клетках понизился и составил: в облученных дозой

30 Гр – $83,5 \pm 4,15\%$ ($N=3$, доноры №1-3), в облученных 10 Гр – $53,9 \pm 7,8\%$ ($N=3$, доноры №4-6) и в облученных 5 Гр – $32,0 \pm 16,4\%$ ($N=3$, доноры №7-9) (рисунок 2).

Было установлено, что минимальным цитотоксическим действием в течение этого периода времени обладает доза 5 Гр, которая позволяет проводить анализ повреждений ДНК и ее репарации не только сразу после ионизирующего облучения, но и через сутки после него. Количество погибших клеток через 24 часа составило: $86,4 \pm 6,2\%$ ($N=3$, доноры №1-3) при дозе 30 Гр, $52,4 \pm 13,5\%$ ($N=3$, доноры №4-6) при дозе 10 Гр и $20,3 \pm 8,9\%$ ($N=3$, доноры №7-9) при дозе 5 Гр (рисунок 2).

При воздействии на клетки ионизирующей радиации в 30 и 10 Гр образуются повреждения ДНК различного характера, в том числе и двунитевые разрывы. Однако, через 24 часа большое количество клеток подвергается апоптозу, во время которого ДНК также фрагментируется (вторичные повреждения ДНК), и происходит фосфорилирование гистона H2AX. Таким образом, при воздействии на клетки этой дозы излучения сложно отличить первичные повреждения ДНК от вторичных.

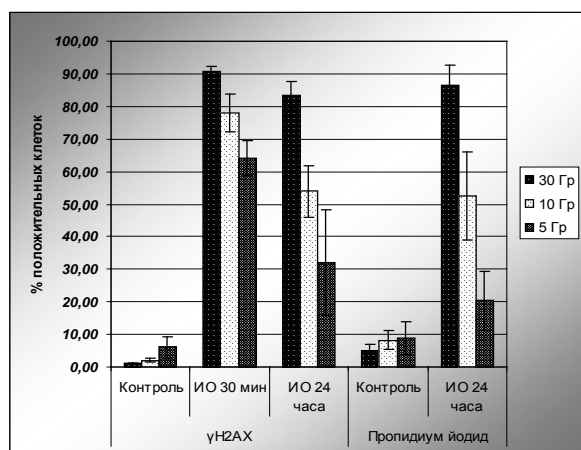


Рисунок 2 – Количество клеток, активно накапливающих γ H2AX и пропидиум йодид при культивировании их 24 часа без воздействия (Контроль) и с воздействием ионизирующего облучения (ИО) различной дозы. Показаны результаты исследования доноров №1-9 (30 Гр – доза облучения для группы доноров №1-3, 10 Гр – для группы доноров №4-6, 5 Гр – для группы доноров №7-9)

Лимфоциты 3-х доноров (№10-12) анализировали также с помощью конфокальной микроскопии. Среднее количество двунитевых разрывов ДНК на клетку, визуализированных по γ H2AX фокусам, составило: в контрольных клетках через 30 мин – $1,4 \pm 0,4$, в контрольных клетках через 24 часа – $1,8 \pm 0,1$, в клетках через 30 мин после облучения – $17,2 \pm 4,3$, и в клетках через 24 часа после облучения – $6,2 \pm 0,2$. На рисунке 3 показан пример выявления двунитевых разрывов ДНК по γ H2AX фокусам в лимфоцитах донора №10.

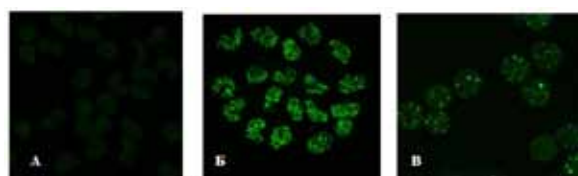
После облучения лимфоцитов дозой 10 Гр и выше количество γ H2AX фокусов в ядрах очень велико (данные не представлены), что затрудняет визуализацию и количественную оценку двунитевых разрывов ДНК. Таким образом, для оценки репаративного ответа клеток по γ H2AX фокусам с помощью метода конфокальной микроскопии также была выбрана доза облучения – 5 Гр.

Методом конфокальной микроскопии было исследовано образование и разрушение γ H2AX фокусов в лимфоцитах крови 2-х пациентов с анемией Фанкони. В каждом случае

также проводился анализ не менее 100 ядер. Количество фокусов на клетку составило для 1-ого пациента – 5,29 в контрольных клетках и 14,16 в облученных клетках через 30 мин после воздействия ионизирующего излучения, 4,48 в контрольных и 10,10 в облученных клетках через 24 часа. Для 2-ого пациента количество γ H2AX фокусов на клетку составило: через 30 мин 4,35 в контрольных и 27,29 в облученных клетках, а через 24 часа 4,31 и 10,60 в контрольных и облученных клетках соответственно. Таким образом, количество разрывов ДНК через 30 мин и 24 часа в контрольных клетках пациентов с анемией Фанкони было повышено по сравнению с таковым в клетках здоровых доноров, что может быть связано с повышенной спонтанной ломкостью хромосом. Количество «несшитых» двунитевых разрывов (γ H2AX фокусов) в облученных клетках через 24 часа после воздействия было также выше у пациентов с анемией Фанкони, чем у здоровых доноров.

Заключение

В результате проведенных исследований был оптимизирован метод определения репаративного ответа лимфоцитов крови после воздействия на них ионизирующего излучения. Уровень индуцированного повреждения ДНК (двунитевых разрывов) и репаративного ответа лимфоцитов можно определять по количеству клеток, экспрессирующих γ H2AX, методом проточной цитофлуориметрии и по количеству γ H2AX фокусов на клетку с помощью конфокальной микроскопии. Было установлено, что наименьшим цитотоксическим действием обладает доза 5 Гр, а время 30 мин и 24 часа



А – клетки без воздействия, Б – клетки через 30 мин после ионизирующего облучения (ИО), В – клетки через 24 часа после ИО

Рисунок 3 – γ H2AX фокусы в лимфоцитах донора №10 после ионизирующего облучения дозой 5 Гр

после облучения позволяют оценить воздействие ДНК-повреждающего фактора (ионизирующего излучения) на клетки. Для выделения и приготовления образцов клеток требуется небольшое количество исследуемого материала (2-4 мл периферической крови/костного мозга). Было отмечено также, что данный метод позволяет определять даже незначительные различия между эффективностью репарации ДНК в клетках здоровых доноров и пациентов с синдромом хромосомной нестабильности.

Библиографический список

1. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. // E. Dicomety [et al.] / Int.J.Radiat.Biol. – 1998. – V. 73. – P. 269-278.

2. Response to X-Irradiation of Fanconi Anemia Homozygous and Heterozygous cells assessed by the single-cell gel electrophoresis (Comet) Assay. // Cholpon S. Djuzenova

[et al.] / Laboratory Investigation. – 2001. – V. 81. – P. 185-192.

3. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. // A. Kinner [et al.] / Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36. – P. 5678-5694.

4. Sedelnikova, Olga A. γ H2AX and cancer. // Olga A. Sedelnikova / Nature reviews. – 2008. – V. 8. – P. 957-967

5. Fanconi Anemia is characterized by delayed repair kinetics of DNA double-strand breaks. // A.Leskovas [et al.] / Tohoku J.Exp. Med. – 2010. – V. 221. – P. 69-76.

6. A rapid flow cytometry test based on histone H2AX phosphorylation for the sensitive and specific diagnosis of ataxia telangiectasia. // P. Porcedda [et al.] / Cytometry Part A. – 2008. – V. 73A. – P. 508-516.

7. Huang, X. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. // X. Huang, Z. Darzynkiewicz / Methods Mol Biol. – 2006. – V. 314. – P. 73-80.

A. Tarasova, T. Shman

DNA DOUBLE-STRAND BREAKS REPAIR DETECTION IN LYMPHOCYTES BASED ON HISTONE H2AX PHOSPHORYLATION

We used γ H2AX phosphorylation assay as an accurate and sensitive method of DNA double strand break detection to estimate whether measuring of DNA repair kinetics can help in diagnosis such bone marrow failure syndrome as Fanconi anemia, Nijmegen syndrome and ataxia-telangiectasia. Lymphocytes from 12 healthy donors and 2 patients diagnosed as Fanconi anemia were γ -irradiated at different doses and DNA repair efficiency was assessed. The most appropriate conditions for testing of DNA repair kinetics in lymphocytes were selected. We proposed to analyse lymphocytes 30 min and 24 hours after γ -irradiation at dose 5 Gy with anti- γ H2AX-antibody staining by flow cytometry or confocal microscopy as additional diagnostic test of chromosomal instability diseases.

Key words: γ -irradiation, DNA double-strand breaks, histone γ H2AX, chromosomal instability syndromes

Поступила 16.03.11