

DOI: 10.12737/article_5a855c9d5b1211.49546901

Н.Ю. Воробьева, В.В. Уйба, О.А. Кочетков, Т.А. Астрелина, М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, Т.М. Блохина, Е.И. Яшкина, Д.И. Кабанов, В.А. Никитина, Ю.Б. Сучкова, И.В. Кобзева, А.Н. Осипов

ВЛИЯНИЕ ³Н-ТИМИДИНА НА ИНДУКЦИЮ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва
E-mail: andreyan.osipov@gmail.com

Н.Ю. Воробьева – с.н.с., к.б.н.; В.В. Уйба – руководитель ФМБА России, д.м.н., проф.; О.А. Кочетков – зав. лабораторией, к.т.н.; Т.А. Астрелина – рук. центра биомедицинских технологий, д.м.н.; М.В. Пустовалова – н.с.; А.К. Грехова – м.н.с.; Т.М. Блохина – н.с.; Е.И. Яшкина – м.н.с.; Д.И. Кабанов – инженер; В.А. Никитина – в.н.с., к.м.н.; Ю.Б. Сучкова – с.н.с., к.м.н.; И.В. Кобзева – с.н.с., к.м.н.; А.Н. Осипов – зав. отделом, д.б.н., проф.

Реферат

Цель: оценить влияние ³Н-тимидина на индукцию двунитевых разрывов (ДР) ДНК в культивируемых мезенхимальных стволовых клетках (МСК) человека.

Материал и методы: Выделение и культивирование МСК костного мозга человека проводили по стандартной методике. К культуре клеток добавляли стерильный раствора ³Н-тимидина с различной удельной радиоактивностью и инкубировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 24 ч. Удельная радиоактивность ³Н-тимидина в среде инкубации составляла 50–1600 кБк/мл. Для количественной оценки ДР ДНК использовали иммуноцитохимический анализ фокусов гистона γH2AX. Дополнительно оценивали долю делящихся клеток с использованием иммуноцитохимического анализа маркера клеточной пролиферации – белка Ki67.

Результаты: Показано, что 24 ч инкубация МСК человека в культуральной среде, приводит к дозозависимому увеличению количества фокусов γH2AX. Наблюдается линейное увеличение числа фокусов γH2AX в диапазоне удельных активностей 50–400 кБк/мл, после чего относительный количественный выход фокусов на единицу удельной радиоактивности начинает снижаться. В целом, зависимость доза–эффект аппроксимируется квадратичной функцией $y = 3,13 + 50,80x - 12,38x^2$ ($R^2 = 0,99$), где y – количество фокусов γH2AX в клеточном ядре, а x – удельная радиоактивность в единицах 1000 кБк/мл. Обнаружено, что 24 ч инкубация МСК человека в культуральной среде, содержащей 800 и 1600 кБк/мл ³Н-тимидина, приводит к статистически значимому снижению пролиферативной активности клеток по сравнению с контролем ~ в 1,25 и 1,41 раза соответственно. Своеобразное биологическое ограничение накопления трития в клеточном ядре хорошо объясняет наблюдаемый в наших исследованиях нелинейный характер зависимости образования ДР ДНК от удельной радиоактивности ³Н-тимидина в культуральной среде.

Заключение: Количественный анализ фокусов γH2AX показал себя как хорошо воспроизводимый и высокочувствительный метод оценки индукции ДР ДНК в живых клетках при воздействии ³Н-тимидина. Анализ фокусов γH2AX будет крайне востребован для уточнения количественного выхода ДР ДНК в живых клетках на дозу β-излучения трития. Для этого необходимо провести корректный расчет дозы, получаемой клетками с учетом микрораспределения ³Н-тимидина в клеточном объеме и его накопления в ДНК живых клеток.

Ключевые слова: ³Н-тимидин, двунитевые разрывы ДНК, фокусы γH2AX, мезенхимальные стволовые клетки

Поступила: 02.10.2017. Принята к публикации: 06.12.2017

Введение

Тритий (³Н), радиоактивный изотоп водорода, является одним из основных побочных продуктов ядерной промышленности, попадающих в окружающую среду [1, 2]. Тритий превращается в стабильный изотоп гелия путем β-распада, излучая низкоэнергетический электрон со средней энергией 5,7 кэВ и частицу антинейтрино. В среднем длина пробега β-частицы, испускаемой тритием, составляет всего 0,4–0,6 мкм, что значительно меньше диаметра ядра соматической клетки [3]. Таким образом, тритий представляет опасность для здоровья человека только при поступлении в организм. В качестве изотопа водорода тритий входит в состав молекул воды (оксид трития – НТО), неорганических и органических молекул (органически связанный тритий – ОСТ) [4].

В последнее время, в связи с ожидаемым ростом мирового производства ядерной энергии и развитием термоядерных технологий, возросли опасения по поводу потенциальных последствий поступления трития в организм для здоровья человека [5]. Ситуацию усугубляет тот факт, что, к сожалению, биологические эффекты воздействия трития, а, в особенности, его органических соединений исследованы недостаточно.

Это видно, прежде всего, из крайне широкого диапазона значений относительной биологической эффективности (ОБЭ), получаемых экспериментально для соединений трития [6, 7]. Значение ОБЭ показывает, насколько эффективен определенный тип излучения, вызывающий негативные биологические эффекты, относительно эталонного фотонного излучения, такого как γ- или рентгеновское.

Международная комиссия по радиационной защите (МКРЗ) в настоящее время рекомендует ОБЭ = 1 при оценке эквивалентной дозы для фотонного излучения и электронов всех энергий, включая β-частицы, испускаемые при распаде трития [8]. Однако экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ОБЭ даже для оксида трития (НТО) ~1,5–2 раза выше, чем для фотонного излучения [9], тогда как значения ОБЭ для органических соединений трития, по разным оценкам, доходят до ~8–12 [9–12].

Вызывают тревогу результаты молекулярно-генетического обследования персонала тритиевого производства РФЯЦ ВНИИЭФ, выполненные коллективом под руководством И.Б. Корзеновой [13]. Было показано, что у людей, длительно работавших с соединениями трития и хронически облучавшихся в малых дозах (в среднем $77,5 \pm 19,4$ мЗв), часто наблюдается увеличе-

ние количества разрывов ДНК в лимфоцитах и содержания внеклеточной ДНК в плазме крови [13].

Известно, что среди повреждений ДНК, вызываемых ионизирующим излучением, наиболее критическими для дальнейшей судьбы клетки являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК [14–16]. Репарация этих повреждений ДНК происходит медленно, в то время как ДР, не устраненные в ходе репарации ДНК или элиминации клеток, приводят к серьезным цитогенетическим нарушениям, инактивации генов супрессоров опухолей или активации онкогенов [17]. Теоретические расчеты показывают, что выход ДР ДНК, индуцированных β -частицами трития ДНК, в $\sim 1,3$ – $2,0$ раза выше, чем при воздействии γ -излучения ^{60}Co в той же дозе [3, 18, 19]. Однако надо понимать, что эти расчеты получены на основе экспериментальных данных облучения выделенной или плазмидной ДНК. Детальных сравнительных экспериментальных исследований особенностей индукции ДР ДНК в эукариотических клетках, учитывающих микрораспределение соединений трития в клеточном ядре и в структуре хроматина, в литературе практически нет. Это обусловлено тем, что классические методы анализа ДР, основанные на изменении степени фрагментации двунитевой ДНК (электрофоретическая подвижность, вязкость, седиментация и т.д.), не позволяли оценивать изменения количества ДР при дозах меньше 5–10 Гр [20].

С другой стороны, в последнее время активно развиваются новые технологии количественного анализа ДР, основанные на иммуоцитохимическом анализе количества динамических микроструктур, образующихся в местах репарации двунитевых разрывов ДНК и состоящих из белков, участвующих в репарации этих повреждений [21–25]. Эти микроструктуры получили название фокусы (foci). Полагают, что при воздействии редкоизионизирующего излучения один фокус соответствует сайту репарации одного двунитевого разрыва (ДР) ДНК [26]. Количественный анализ фокусов белков репарации ДНК в настоящее время считается самым чувствительным методом анализа ДР ДНК и позволяет детектировать увеличение количества ДР ДНК при дозах облучения всего в несколько мЗв [27]. Помимо высокой чувствительности этот метод позволяет учитывать пространственное расположение ДР ДНК в клеточном ядре.

Однако, несмотря на очевидные достоинства этого метода, до настоящего времени не проводилось детальных исследований закономерностей изменений количества фокусов белков репарации ДНК в клетках млекопитающих при воздействии различных соединений трития. Имеются лишь единичные работы в этой области. Так, было показано, воздействие НТО в малой дозе (16,72 мГр) вызывало в культуре клеток линии MG-63 (остеосаркома человека) статистически достоверное увеличение количества фокусов фосфорилированного корового гистона H2AX (γ H2AX), считающегося маркерным белком репарации ДР ДНК [28]. Фосфорилирование гистона H2AX осуществля-

ется киназами ATM, ATR и DNA-PK в ответ на образование ДР ДНК и свидетельствует о распознавании [15]. В другой работе проводили сравнительные исследования влияния тимидина, меченного тритием или ^{14}C на образование и репарацию ДР ДНК в клетках линии СНО [29]. Было показано, что ^3H -тимидин более эффективен по сравнению с ^{14}C -тимидином в тех же дозах. Клетки, дефектные по белкам гомологичной рекомбинации, были чувствительны даже к малым дозам ^3H -тимидина [29]. Авторы приходят к заключению, что низкоэнергетическое β -излучение трития может индуцировать генетическую нестабильность при воздействии в малых, нетоксичных для клеток дозах [29].

Цель настоящей работы состояла в изучении количественных изменений маркера ДР ДНК – фокусов γ H2AX в культивируемых мезенхимальных стволовых клетках (МСК) человека при воздействии ^3H -тимидина с различной удельной радиоактивностью в культуральной среде (50–1600 кБк/мл).

Выбор МСК в качестве объекта исследований был обусловлен их высоким пролиферативным потенциалом и возможностью накопления нарушений и мутаций с последующей их передачей более высококодифференцированным клеточным потомкам.

Материал и методы

Выделение и культивирование клеток

Для получения первичной культуры МСК проводили выделение мононуклеарной фракции лейкоцитов из костного мозга на градиенте плотности (фиколл 1,077 г/мл, Lympholyte[®], Cedarlane, Канада). Культивирование МСК костного мозга проводилось в культуральных вентилируемых флаконах с площадью дна 25 см² (Corning[®], США) в концентрации $0,3 \times 10^6$ на флакон в культуральной среде (MesenCult[™] MSC Basal Medium with supplement, StemCell[™] Technologies, Канада) с добавлением L-глутамина и антибиотиков (пенициллин-стрептомицин, Sigma-Aldrich, США). Культивирование МСК костного мозга проводили в стандартных условиях CO₂-инкубатора. Клетки культивировали до 3 пассажа, со сменой среды один раз в три дня. При достижении 75–80 % монослоя, клеточную культуру снимали с пластика ферментативным путем. Осадок ресуспендировали в фосфатном буфере (PBS, Life Technologies, Gibco[®], USA), после чего производили подсчет количества жизнеспособных клеток.

Оценка уровня экспрессии поверхностных клеточных маркеров МСК костного мозга проводилась на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (Becton Dickinson Bioscience, США). Окрашивание клеток проводилось моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами CD45-FITC, CD73-PE, CD90-PE, CD105-APC, CD44-FITC, CD34-FITC, CD54-FITC, CD31-PE, CD133-PE, CD63-FITC, CD13-FITC, CD117-APC, HLA-DR-APC (BD Biosciences и Becton Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки пассировали на покровных стеклах в чашках Петри (d = 35 мм, Corning[®],

США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета 5×10^3 кл/см². Для адгезии клеток на стеклах, рабочую среду (1,5 мл) добавляли через 15 мин. Инкубация перед экспериментами проводилась в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂) в течение 24 ч.

Инкубация клеток с оксидом трития с различной удельной радиоактивностью

К культуре клеток добавляли стерильный раствор ³H-тимидина с различной удельной радиоактивностью и инкубировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 24 ч. Удельная радиоактивность ³H-тимидина в среде инкубации составляла 50–1600 кБк/мл.

Иммуноцитохимические исследования

Клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (4 % в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4). Пермеабилizировали 0,3 % Тритон-Х100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина, для блокирования неспецифического связывания. Слайды инкубировали с первичными антителами (кроличьи моноклональные антитела к белку γ H2AX (клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) в разведении 1/200 и мышиные моноклональные антитела к белку Ki67 (клон Ki-S5, Merck-Millipore, США) в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем слайды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с rhodamine (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотоблещивания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм возбуждение и 435–485 нм эмиссия), B-2E/C (465–495 нм возбуждение и 515–555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540–580 нм возбуждение и 600–660 нм эмиссия). Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов использовали программу Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>).

На рис. 1 представлен пример анализа фокусов γ H2AX в МСК человека.

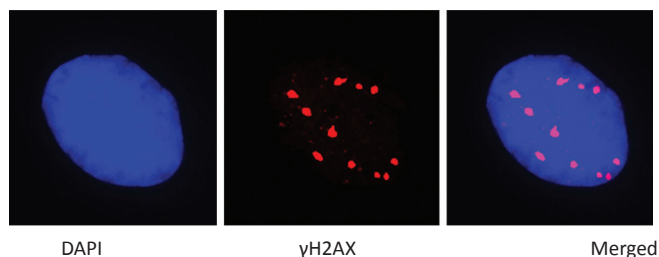


Рис. 1. Микрофотография ядра мезенхимальной стволовой клетки человека. Слева направо: ДНК клеточного ядра, окрашенное DAPI (синий), фокусы γ H2AX (красные точки), наложенные микроизображения (merged)

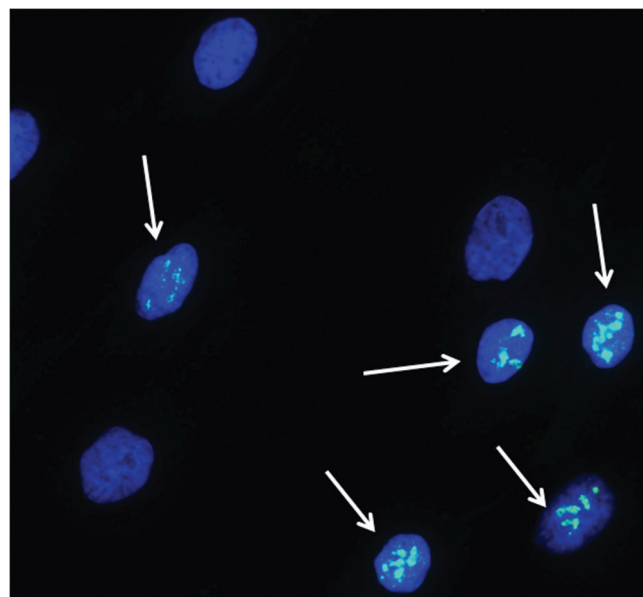


Рис. 2. Микрофотография ядер мезенхимальных стволовых клеток человека. Стрелками показаны Ki67 позитивные ядра. Синий – ядра клеток, окрашенные DAPI. Зеленый – белок Ki-67

Выборочная микрофотография Ki67 позитивных (Ki67⁺) и Ki67 негативных (Ki67⁻) ядер МСК представлены на рис. 2.

Статистический анализ

Статистический и математический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов \pm стандартная погрешность.

Результаты и обсуждение

Во время культивирования на клетках отмечалась высокая экспрессия поверхностных маркеров CD73, CD90, CD105 и CD13 – 99,7, 99,6, 99,6 и 99,8 % соответственно, а также низкая экспрессия маркеров гемопоэтического ряда (CD45, CD133, CD34, CD117, HLA-DR).

В ходе исследований влияния ³H-тимидина на индукцию ДР ДНК показано, что количество ДР ДНК, оцененных по количеству фокусов белка-маркера ДР ДНК – γ H2AX, статистически достоверно ($p = 0,042$) увеличивается через 24 ч инкубации с $2,21 \pm 0,58$ до $6,02 \pm 1,15$ фокусов на клетку уже при самой низкой

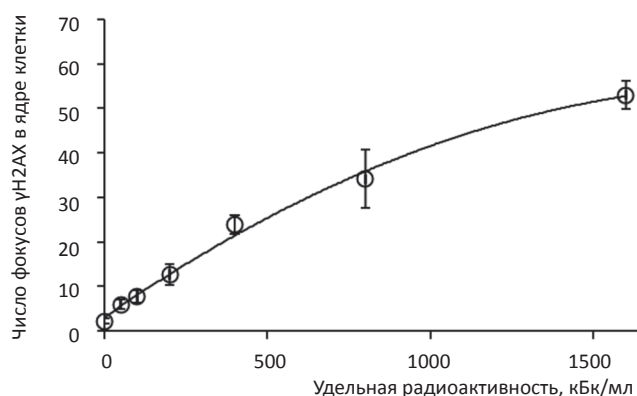


Рис. 3. Влияние ³H-тимидина на выход двунигетевых разрывов ДНК в культивируемых мезенхимальных стволовых клетках человека

удельной радиоактивности ³H-тимидина в культуральной среде (50 кБк/мл). С увеличением удельной радиоактивности в культуральной среде до 1600 кБк/мл отмечалось дальнейшее увеличение количества фокусов γ H2AX (рис. 3). Зависимость изменений количества фокусов γ H2AX от удельной радиоактивности можно описать линейным уравнением $y = 2,21 + 34,67x$ ($R^2 = 0,94$), где y – количество фокусов γ H2AX в клеточном ядре, а x – удельная радиоактивность в единицах 1000 кБк/мл. Однако гораздо лучше данная зависимость аппроксимируется квадратичной функцией $y = 3,13 + 50,80x - 12,38x^2$ ($R^2 = 0,99$), где y – количество фокусов γ H2AX в клеточном ядре, а x – удельная радиоактивность в 1000 кБк/мл. Наблюдается линейное увеличение фокусов γ H2AX в диапазоне 0–400 кБк/мл, после чего относительный количественный выход фокусов на единицу удельной радиоактивности начинает снижаться (рис. 3). Такой характер кривой доза-эффект говорит о включении механизмов, снижающих проявление наблюдаемого эффекта. В случае длительного облучения, когда идет одновременная индукция повреждений и их репарация, эффект насыщение/плато чаще всего объясняется наступлением баланса между процессами образования и репарации повреждений ДНК [16, 30–32].

Однако в случае ³H-тимидина ситуация сложнее. Известно, что ³H-тимидин включается в структуру ДНК только при синтезе молекулы, то есть во время процессов репликации ДНК в S-фазе (фаза синтеза ДНК) клеточного цикла или во время репарации ДНК [33]. Таким образом, эффект насыщение/плато отражает и процесс включения ³H-тимидина в структуру ДНК. При этом, помимо физико-химического ограничения скорости включения ³H-тимидина в ДНК, обусловленного скоростью работы ферментов, в асинхронных популяциях живых клетках этот процесс будет, в первую очередь, зависеть от доли клеток в S-фазе. Долгое время, на основании результатов многочисленных экспериментов на растворах ДНК, считалось, что включение ³H-тимидина прямо пропорционально скорости синтеза ДНК и никак не отражается на способности клеток к репликации ДНК. Более того, измерение удельной радиоактивности β -излучения, вклю-

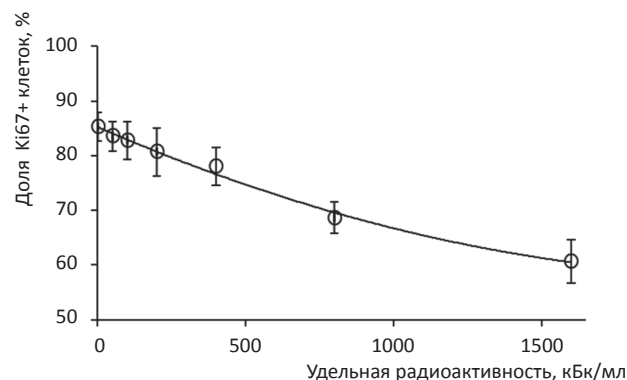


Рис. 4. Влияние ³H-тимидина на пролиферативную активность культивируемых мезенхимальных стволовых клеток человека

ченного в ДНК ³H-тимидина, часто используется для оценки пролиферативной активности клеток. Однако этот метод не является корректным для живых клеток, так как ³H-тимидин может ингибировать клеточную пролиферацию [34, 35].

Для того чтобы учесть возможное ингибирование пролиферативной активности ³H-тимидином, нами была проведена оценка доли делящихся клеток с использованием иммуноцитохимического анализа маркера клеточной пролиферации – белка Ki67. Этот белок присутствует в пролиферирующих, но отсутствует в покоящихся клетках [36].

Из результатов, представленных на рис. 4, видно, что 24 ч инкубация клеток с ³H-тимидином с удельной радиоактивностью в культуральной среде 800 кБк снижает пролиферативную активность клеток по сравнению с контролем в ~1,25 раза ($p = 0,013$). Увеличение удельной радиоактивности до 1600 кБк приводит к еще более выраженному эффекту в (~1,41 раза, $p = 0,007$).

Таким образом, полученные результаты полностью подтверждают сделанное нами предположение о том, что ³H-тимидин приводит к снижению пролиферативной активности клеток, что, в свою очередь, останавливает процесс его включения в структуру ДНК. Своеобразное биологическое ограничение накопления трития в клеточном ядре хорошо объясняет наблюдаемый в наших исследованиях нелинейный характер зависимости образования ДР ДНК от удельной радиоактивности ³H-тимидина в культуральной среде.

Заключение

Количественный анализ фокусов γ H2AX показал себя хорошо воспроизводимым и высокочувствительным методом оценки индукции ДР ДНК в живых клетках при воздействии ³H-тимидина. Анализ фокусов γ H2AX будет востребован для уточнения количественного выхода ДР ДНК в живых клетках в зависимости от поглощенной дозы β -излучения трития. Для этого необходимо провести корректный расчет дозы, получаемой клетками с учетом микрораспределения ³H-тимидина в клеточном объеме, и его накопления в ДНК живых клеток. Этому будет посвящен следующий этап нашей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotzer T., Trivedi A. Dosimetric implications of atmospheric dispersal of tritium near a heavy-water research reactor facility // *Radiat. Prot. Dosim.* 2001. Vol. 93. P. 61–66.
2. Okada S., Momoshima N. Overview of tritium. characteristics, sources, and problems // *Health Phys.* 1993. Vol. 65. P. 595–609.
3. Alloni D., Cutaia C., Mariotti L. et al. Modeling dose deposition and DNA damage due to low-energy beta(-) emitters // *Radiat. Res.* 2014. Vol. 182. P. 322–330.
4. Melintescu A., Galeriu D. Uncertainty of current understanding regarding OBT formation in plants // *J. Environ. Radioact.* 2017. Vol. 167. P. 134–149.
5. Dingwall S., Mills C.E., Phan N. et al. Human health and the biological effects of tritium in drinking water. Prudent policy through science – addressing the ODWAC new recommendation // *Dose Response.* 2011. Vol. 9. P. 6–31.
6. Umata T. Estimation of biological effects of tritium // *J. UOEH.* 2017. Vol. 39. P. 25–33.
7. Little M.P., Lambert B.E. Systematic review of experimental studies on the relative biological effectiveness of tritium // *Radiat. Environ. Biophys.* 2008. Vol. 47. P. 71–93.
8. Task Group on Radiation Quality Effects in Radiological Protection CoREICoRP. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (w(R)). A report of the International Commission on Radiological Protection // *Ann ICRP.* 2003. Vol. 33. P. 1–117.
9. Harrison J. Doses and risks from tritiated water and environmental organically bound tritium // *J. Radiol. Prot.* 2009. Vol. 29. P. 335–349.
10. Balonov M.I., Muksinova K.N., Mushkacheva G.S. Tritium radiobiological effects in mammals. review of experiments of the last decade in Russia // *Health Phys.* 1993. Vol. 65. P. 713–726.
11. Балонов М.И., Чипига Л.А. Оценка дозы от поступления окиси трития в организм человека. Роль включения трития в органическое вещество тканей // *Радиационная гигиена.* 2016. Т. 9. №4. С. 16 – 25.
12. Кочетков О.А., Монастырская С.Г., Кабанов Д.И. Проблемы нормирования техногенного трития // *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2013. Т. 9. №4. С. 815–819.
13. Korzeneva I.B., Kostuyk S.V., Ershova L.S. et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β -radiation // *Mutation Res./ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2015. Vol. 779. P. 1–15.
14. Osipov A.N., Grekhova A., Pustovalova M. et al. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6. P. 26876–26885.
15. Osipov A.N., Pustovalova M., Grekhova A. et al. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6. P. 27275–27287.
16. Kottenko K.V., Bushmanov A.Y., Ozerov I.V. et al. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to gamma-radiation with different dose rates // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. P. 13719–13726.
17. Halazonetis T.D., Gorgoulis V.G., Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development // *Science.* 2008. Vol. 319. P. 1352–1355.
18. Chen J. Estimated yield of double-strand breaks from internal exposure to tritium // *Radiat. Environ. Biophys.* 2012. Vol. 51. P. 295–302.
19. Moiseenko V.V., Waker A.J., Hamm R.N., Prestwich W.V. Calculation of radiation-induced DNA damage from photons and tritium beta-particles. Part II. Tritium RBE and damage complexity // *Radiat. Environ. Biophys.* 2001. Vol. 40. P. 33–38.
20. Vignard J., Mirey G., Salles B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks. A direct and indirect lighting up // *Radiother. Oncol.* 2013. Vol. 108. № 3. P. 362–369.
21. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation. a marker for DNA damage // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 920. P. 613–626.
22. Tsvetkova A., Ozerov I.V., Pustovalova M et al. γ H2AX, 53BP1 and Rad51 protein foci changes in mesenchymal stem cells during prolonged X-ray irradiation // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8. № 38. P. 64317–64329.
23. Грехова А.К., Еремин П.С., Осипов А.Н. и соавт. Замедленные процессы образования и деградации фокусов γ H2AX в фибробластах кожи человека, облученных рентгеновским излучением в малых дозах // *Радиационная биология. Радиационная экология.* 2015. Т. 55. № 4. С. 395–401.
24. Pustovalova M., Grekhova A., Astrelina T. et al. Accumulation of spontaneous γ H2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells. // *Aging (Albany NY).* 2016. Vol. 8. № 12. P. 3498–3506.
25. Pustovalova M., Astrelina T.A., Grekhova A. et al. Residual γ H2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. // *Aging (Albany NY).* 2017. Vol. 9. №11. P. 2397–2410.
26. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V. et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage // *Curr. Biol.* 2000. Vol. 10. P. 886–895.
27. Lobrich M., Shibata A., Beucher A. et al. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. strengths, limitations and optimization // *Cell Cycle.* 2010. Vol. 9. P. 662–669.
28. Gonen R.G.U., Alfassi Z.B., Priel E. Production of DNA double strand breaks in human cells due to acute exposure to tritiated water (HTO). Conference of the Nuclear Societies in Israel. Dead Sea (Israel). 11–13 Feb 2014. P. 69–73.
29. Saintigny Y., Roche S., Meynard D., Lopez B.S. Homologous recombination is involved in the repair response of mammalian cells to low doses of tritium // *Radiat. Res.* 2008. Vol. 170. P. 172–83.
30. Озеров И.В., Осипов А.Н. Кинетическая модель репарации двунитевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при действии редкоизионизирующего излучения с различной мощностью дозы // *Компьютерные исследования и моделирование.* 2015. Т.7. № 1. С. 159–176.
31. Озеров И.В., Еремин П.С., Осипов А.Н. и соавт. Особенности изменения числа фокусов белков γ H2AX и Rad51 в фибробластах кожи человека, подвергавшихся пролонгированному воздействию низкоинтенсивного рентгеновского излучения // *Саратовский научно-мед. журнал.* 2014. Т. 10. № 4. С. 739–743.
32. Озеров И.В., Бушманов А.Ю., Анчишкина Н.А. и соавт. Индукция и репарация двунитевых разрывов ДНК в клетках линии V79 при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения // *Саратовский научно-мед. журнал.* 2013. Т. 9. № 4. С. 787–791.
33. Duque A., Rakic P. Different effects of BrdU and 3 H-Thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position and fate // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31. № 42. P. 15205–15217.
34. Hoy C.A., Lewis E.D., Schimke R.T. Perturbation of DNA replication and cell cycle progression by commonly used [3 H] thymidine labeling protocols // *Mol. Cell Biol.* 1990 Apr. Vol. 10. № 4. P. 1584–1592.
35. Hu V.W., Black G.E., Torres-Duarte A., Abramson F.P. 3 H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis // *FASEB J.* 2002. Vol. 16. № 11. P. 1456–1457.
36. Jurikova M., Danihel L., Polak S., Varga I. Ki67, pcna, and mcm proteins. Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer // *Acta Histochemica* 2016. Vol. 118. P. 544–552.

Для цитирования: Воробьева Н.Ю., Уйба В.В., Кочетков О.А., Астрелина Т.А., Пустовалова М.В., Грехова А.К., Блохина Т.М., Яшкина Е.И., Кабанов Д.И., Никитина В.А., Сучкова Ю.Б., Кобзева И.В., Осипов А.Н. Влияние 3 H-тимидина на индукцию двунитевых разрывов ДНК в мезенхимальных стволовых клетках человека // *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2018. Т. 63. № 1. С. 28–34. DOI: 10.12737/article_5a855c9d5b1211.49546901

DOI: 10.12737/article_5a855c9d5b1211.49546901

³H-Thymidine Influence on DNA Double Strand Breaks Induction in Cultured Human Mesenchymal Stem Cells

N.Yu. Vorobyeva, V.V. Uyba, O.A. Kochetkov, T.A. Astrelina, M.V. Pustovalova, A.K. Grekhova, T.M. Blokhina, E.I. Yashkina, D.I. Kabanov, V.A. Nikitina, Yu.B. Suchkova, I.V. Kobzeva, A.N. Osipov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia.
E-mail: andreyan.osipov@gmail.com

N.Yu. Vorobyeva – Senior Researcher, PhD Biol.; V.V. Uyba – Head of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Dr. Sc. Med., Prof.; O.A. Kochetkov – Head of Lab., PhD Tech.; T.A. Astrelina – Head of Center for Biomedical Technologies, Dr. Sc. Med.; M.V. Pustovalova – Research Fellow; A.K. Grekhova – Junior Researcher; T.M. Blokhina – Research Fellow; E.I. Yashkina – Junior Researcher; D.I. Kabanov – Engineer; V.A. Nikitina – Leading Researcher, PhD Med.; Yu.B. Suchkova – Senior Researcher, PhD Med.; I.V. Kobzeva – Senior Researcher, PhD Med.; A.N. Osipov – Head of Dep., Dr. Biol. Sc., Prof.

Abstract

Purpose: To estimate the impact of ³H-thymidine on DNA double strand breaks (DSBs) induction in cultured human mesenchymal stem cells (MSC).

Material and methods: Isolation and cultivation of human bone marrow MSC was carried out according to a standard procedure. A sterile solution of ³H-thymidine with different specific radioactivity was added to the cell culture and incubated under the conditions of the CO₂ incubator for 24 hours. The specific radioactivity of ³H-thymidine in the incubation medium was 50–1600 kBq/ml. To evaluate quantitatively the DSBs, an immunocytochemical analysis of the DSB marker – phosphorylated histone (γH2AX) foci was used. Additionally, the proportion of dividing cells was estimated using an immunocytochemical analysis of the cell proliferation marker, the Ki67 protein.

Results: It was shown that 24 h incubation of human MSC in a culture medium results in a dose-dependent increase in γH2AX foci. There is a linear increase in the foci γH2AX in the range of 50–400 kBq/ml, after which the relative quantitative yield of foci per unit of specific radioactivity begins to decrease. In general, the dose-effect relationship is approximated by the quadratic function $y = 3.13 + 50.80x - 12.38x^2$ ($R^2 = 0.99$), where y is the number of foci γH2AX in the cell nucleus, and x is the specific radioactivity in 1000 kBq/ml. It was found that incubation of human MSC in a culture medium containing 800 and 1600 kBq/ml of ³H-thymidine resulted in a statistically significant decrease in the cells proliferative activity compared to the control of ~1.25 and 1.41 respectively. The peculiar biological limitation of tritium accumulation in the cell nucleus explains well the nonlinear character of the dependence of the formation of DSBs on the specific radioactivity of ³H-thymidine in the culture medium observed in our study.

Conclusion: Quantitative analysis of γH2AX foci has proved to be a highly reproducible and highly sensitive method for evaluating the induction of DSBs in living cells under the action of ³H-thymidine. An analysis of the foci of γH2AX will be useful for accurate estimating the quantitative yield of DSBs in living cells per dose of ³H-thymidine β-radiation. To do this, it is necessary to make a correct calculation of the doses received by the cells taking into account the microdistribution of ³H-thymidine in the cell volume and its accumulation in the DNA of living cells.

Key words: ³H-thymidine, DNA double strand breaks, γH2AX foci, mesenchymal stem cells

REFERENCES

- Kotzer T, Trivedi A. Dosimetric implications of atmospheric dispersal of tritium near a heavy-water research reactor facility. *Radiat. Prot. Dosim.* 2001;93:61–66.
- Okada S, Momoshima N. Overview of tritium. characteristics, sources, and problems. *Health Phys.* 1993;65:595–609.
- Alloni D, Cutaia C, Mariotti L. et al. Modeling dose deposition and DNA damage due to low-energy beta(-) emitters. *Radiat. Res.* 2014;182:322–330.
- Melintescu A, Galeriu D. Uncertainty of current understanding regarding OBT formation in plants. *J. Environ. Radioact.* 2017;167:134–149.
- Dingwall S, Mills CE, Phan N, et al. Human health and the biological effects of tritium in drinking water. Prudent policy through science – addressing the ODWAC new recommendation. *Dose Response.* 2011;9:6–31.
- Umata T. Estimation of biological effects of tritium. *J. UOEH.* 2017;39:25–33.
- Little M.P, Lambert B.E. Systematic review of experimental studies on the relative biological effectiveness of tritium. *Radiat. Environ. Biophys.* 2008;47:71–93.
- Task Group on Radiation Quality Effects in Radiological Protection CoREICoRP. Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (w(R)). A report of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP.* 2003;33:1–117.
- Harrison J. Doses and risks from tritiated water and environmental organically bound tritium. *J. Radiol. Prot.* 2009;29:335–349.
- Balonov MI, Muksinova KN, Mushkacheva GS. Tritium radiobiological effects in mammals. review of experiments of the last decade in Russia. *Health Phys.* 1993;65:713–726.
- Balonov MI, Chipiga LA. Estimation of the dose from the intake of tritium oxide in the human body. The role of inclusion of tritium in the organic matter of tissues. *Radiats. Gigiena ('Radiation Hygiene').* 2016;9(4):16–25. (In Russian. English abstracts. PubMed)
- Kochetkov OA, Monastyrskaya SG, Kabanov DI. Problems of rationing technogenic tritium. *Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2013;9(4):815–819. (In Russian. English abstracts. PubMed)
- Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS, et al. Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium β-radiation. *Mutation Res./ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2015;779:1–15.
- Osipov AN, Grekhova A, Pustovalova M, et al. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation. *Oncotarget.* 2015;6:26876–26885.
- Osipov AN, Pustovalova M, Grekhova A, et al. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells. *Oncotarget.* 2015;6:27275–27287.
- Kotenko KV, Bushmanov AY, Ozerov IV, et al. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to gamma-radiation with different dose rates. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:13719–13726.
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008;319:1352–1355.
- Chen J. Estimated yield of double-strand breaks from internal exposure to tritium. *Radiat. Environ. Biophys.* 2012;51:295–302.
- Moiseenko VV, Waker AJ, Hamm RN, Prestwich WV. Calculation of radiation-induced DNA damage from photons and tritium beta-

- particles. Part II. Tritium RBE and damage complexity. *Radiat. Environ. Biophys.* 2001;40:33–38.
20. Vignard J, Mirey G, Salles B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks. A direct and indirect lighting up. *Radiother. Oncol.* 2013;108(3):362–369.
21. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation. a marker for DNA damage. *Methods Mol. Biol.* 2012;920:613–626.
22. Tsvetkova A, Ozerov I.V, Pustovalova M, et al. γ H2AX, 53BP1 and Rad51 protein foci changes in mesenchymal stem cells during prolonged X-ray irradiation. *Oncotarget.* 2017;8(38):64317–64329.
23. Grekhova AK, Eremin PS, Osipov AN, et al. Delayed processes of γ H2AX foci formation and degradation in human skin fibroblasts irradiated with x-rays in low doses. *Radiats. Biol. Radioecologia* ('Radiation biology. Radioecology'). 2015;55(4):395–401. (In Russian. English abstracts. PubMed)
24. Pustovalova M, Grekhova A, Astrelina T, et al. Accumulation of spontaneous γ H2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells. *Aging (Albany NY).* 2016;8(12):3498–3506.
25. Pustovalova M, Astrelina T.A, Grekhova A, et al. Residual γ H2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. *Aging (Albany NY).* 2017;9. №11:2397–2410.
26. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 2000;10:886–895.
27. Loblrich M, Shibata A, Beucher A, et al. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle.* 2010;9:662–669.
28. Gonen RGU, Alfassi ZB, Priel E. Production of DNA double strand breaks in human cells due to acute exposure to tritiated water (HTO). *Conference of the Nuclear Societies in Israel. Dead Sea (Israel).* 11–13 Feb 2014:69–73.
29. Saintigny Y, Roche S, Meynard D, Lopez BS. Homologous recombination is involved in the repair response of mammalian cells to low doses of tritium. *Radiat. Res.* 2008;170:172–83.
30. Ozerov IV, Osipov AN. Kinetic model of repair of DNA double-strand breaks in primary human fibroblasts under the action of rare-ionizing radiation with different dose rates. *Kompiuternye issledovaniya i modelirovanie* ('Computer Studies and Modeling'). 2015;7(1):159–176. (In Russian. English abstracts. PubMed)
31. Ozerov IV, Eremin PS, Osipov AN, et al. Features of changes in the number of foci of proteins γ H2AX and Rad51 in human fibroblasts subjected to prolonged exposure to low-intensity X-rays. *Saratov Scientific-Medical Journal.* 2014;10(4):739–743. (In Russian. English abstracts. PubMed)
32. Ozerov IV, Bushmanov AYU, Anchishkina NA, et al. Induction and repair of DNA double-strand breaks in V79 cells under long-term exposure to low-intensity γ -radiation. *Saratov Scientific-Medical Journal.* 2013;9(4):787–791. (In Russian. English abstracts. PubMed)
33. Duque A, Rakic P. Different effects of BrdU and 3 H-Thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position and fate. *J. Neurosci.* 2011;31(42):15205–15217.
34. Hoy CA, Lewis ED, Schimke RT. Perturbation of DNA replication and cell cycle progression by commonly used [3 H]thymidine labeling protocols. *Mol. Cell Biol.* 1990 Apr;10(4):1584–1592.
35. Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP. 3 H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *FASEB J.* 2002, Vol. 16(11):1456–1457.
36. Jurikova M, Danihel L, Polak S, Varga I. Ki67, pcna, and mcm proteins. Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica* 2016;118:544–552.

For citation: Vorobyeva NYu, Uyba VV, Kochetkov OA, Astrelina TA, Pustovalova MV, Grekhova AK, Blokhina TM, Yashkina EI, Kabanov DI, Nikitina VA, Suchkova YuB, Kobzeva IV, Osipov AN. 3 H-Thymidine Influence on DNA Double Strand Breaks Induction in Cultured Human Mesenchymal Stem Cells. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2018;63(1):28–34. (In Russ.). DOI: 10.12737/article_5a855c9d5b1211.49546901