

Н.Ю. Воробьева<sup>1,2</sup>, А.А. Осипов<sup>2</sup>, А.К. Чигасова<sup>3</sup>, М.В. Пустовалова<sup>1,4</sup>,  
Д.И. Кабанов<sup>1</sup>, В.Г. Барчуков<sup>1</sup>, О.А. Кочетков<sup>1</sup>, А.Н. Осипов<sup>1,2</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ КОЛИЧЕСТВА ФОКУСОВ $\gamma$ H2AX И 53BP1 В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНКУБИРОВАННЫХ С <sup>3</sup>H-ТИМИДИНОМ ИЛИ ТРИТИРОВАННОЙ ВОДОЙ

<sup>1</sup> Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

<sup>3</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

<sup>4</sup> Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный

Контактное лицо: Наталья Юрьевна Воробьева, e-mail: nuv.rad@mail.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Сравнительное исследование изменений количества фокусов белков-маркеров (ДР) ДНК ( $\gamma$ H2AX и 53BP1) в мезенхимальных стромальных клетках (МСК) человека, инкубированных с <sup>3</sup>H-тимидином или тритированной водой (НТО) в течение 24, 48 и 72 ч.

**Материал и методы:** В работе использовали первичную культуру МСК человека 5–6 пассажа, полученную из коллекции ООО «БиолоТ» (Россия). К питательной среде добавляли стерильный раствор <sup>3</sup>H-тимидина или НТО с удельной активностью от 100 до 400 МБк/л и инкубировали в стандартных условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение 24, 48 и 72 ч. Для количественной оценки фокусов  $\gamma$ H2AX и доли пролиферирующих клеток использовали иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител к  $\gamma$ H2AX, 53BP1 и Ki67 (белок-маркер клеточной пролиферации), соответственно. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборок использовали t-критерий Стьюдента.

**Результаты:** Инкубация МСК с <sup>3</sup>H-тимидином с удельной радиоактивностью 100–400 МБк/л в первые 24 ч приводит к дозозависимому увеличению фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1. При дальнейшем увеличении времени инкубации до 48 ч и 72 ч наблюдается эффект насыщения – количество фокусов выходит на плато. Статистически достоверное увеличение фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в МСК, инкубированных с НТО, наблюдалось только в активно пролиферирующих клетках в первые 24 ч инкубации в среде с удельной активностью 300 и 400 МБк/л, после чего со снижением пролиферативной активности снижалось до контрольных значений. Расчеты, сделанные на основе полученных в ходе работы результатов количественного анализа фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 после инкубации 24 ч МСК с соединениями трития, что при воздействии <sup>3</sup>H-тимидина индуцируется ~ в 6 раз больше двунитевых разрывов ДНК, чем при воздействии НТО.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стромальные клетки,  $\gamma$ H2AX, 53BP1, двунитевые разрывы ДНК, пролиферация клеток, тритий, инкубация

**Для цитирования:** Воробьева Н.Ю., Осипов А.А., Чигасова А.К., Пустовалова М.В., Кабанов Д.И., Барчуков В.Г., Кочетков О.А., Осипов А.Н. Сравнительное исследование изменений количества фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 в мезенхимальных стромальных клетках человека, инкубированных с <sup>3</sup>H-тимидином или тритированной водой // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 3. С. 5–10. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-3-5-10

N.Yu. Vorobyeva<sup>1,2</sup>, A.A. Osipov<sup>2</sup>, A.K. Chigasova<sup>3</sup>, M.V. Pustovalova<sup>1,4</sup>,  
D.I. Kabanov<sup>1</sup>, V.G. Barchukov<sup>1</sup>, O.A. Kochetkov<sup>1</sup>, A.N. Osipov<sup>1,2</sup>

## Comparative Study of Changes in the $\gamma$ H2AX and 53BP1 Foci Number in Human Mesenchymal Stromal Cells Incubated with <sup>3</sup>H-thymidine or Tritiated Water

<sup>1</sup> A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russia

Contact person: N. Yu. Vorobyeva, e-mail: nuv.rad@mail.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** Comparative study of changes in the number of foci of DNA (DSB) marker proteins ( $\gamma$ H2AX and 53BP1) in human mesenchymal stromal cells (MSCs) incubated with <sup>3</sup>H-thymidine or HTO for 24, 48, and 72 h.

**Material and methods:** We used the primary culture of human MSCs of passage 5–6, obtained from the collection of LLC “BioloT” (Russia). A sterile solution of <sup>3</sup>H-thymidine or HTO with a specific activity of 100 to 400 MBq/l was added to the nutrient medium and incubated under standard conditions of a CO<sub>2</sub> incubator for 24, 48, and 72 hours. To quantify  $\gamma$ H2AX foci and the proportion of proliferating cells using antibodies to  $\gamma$ H2AX, 53BP1 and Ki67 (a marker protein for cell proliferation), were used, respectively. Statistical analysis of the obtained data was carried out using the statistical software package Statistica 8.0 (StatSoft). To assess the significance of differences between samples, Student’s t-test was used.

**Results:** Incubation of MSCs with  $^3\text{H}$ -thymidine with a specific radioactivity of 100-400 MBq/l in the first 24 hours leads to a dose-dependent increase in the number of  $\gamma\text{H2AX}$  and 53BP1 foci. With a further increase in the incubation time to 48 h and 72 h, a saturation effect is observed – the number of foci reaches a plateau. A statistically significant increase in the number of  $\gamma\text{H2AX}$  and 53BP1 foci in MSCs incubated with HTO was observed only in actively proliferating cells during the first 24 h of incubation in a medium with specific radioactivity of 300 and 400 MBq/l, after which, with a decrease in proliferative activity, it decreased to control values. Calculations made on the basis of the results of a quantitative analysis of  $\gamma\text{H2AX}$  and 53BP1 foci after 24 h of incubation of MSCs with tritium compounds obtained in the course of the work show, that under the influence of  $^3\text{H}$ -thymidine ~ 6 times more DNA double-strand breaks are induced than under the influence of HTO.

**Keywords:** mesenchymal stromal cells,  $\gamma\text{H2AX}$ , 53BP1, DNA double-strand breaks, cell proliferation, tritium, incubation

**For citation:** Vorobyeva NYu, Osipov AA, Chigasova AK, Pustovalova MV, Kabanov DI, Barchukov V., Kochetkov OA, Osipov AN. Comparative Study of Changes in the  $\gamma\text{H2AX}$  and 53BP1 Foci Number in Human Mesenchymal Stromal Cells Incubated with  $^3\text{H}$ -thymidine or Tritiated Water. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(3):5–10. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-3-5-10

## Введение

Тритий ( $^3\text{H}$ ), радиоактивный изотоп водорода, поступает в окружающую среду в результате природных (взаимодействие космических лучей с атомами в атмосфере) и техногенных (побочные продукты ядерной промышленности) процессов [1]. В замедлителях и теплоносителях тяжеловодных реакторов атомных электростанций тритий, в основном, существует в виде тритированной воды (НТО). Физико-химические свойства НТО в основном такие же, как и у простой воды. Она может легко испаряться в воздухе с образованием паров НТО, которые могут всасываться в организм при вдыхании, поглощении через кожу и проглатывании. Затем тритий равномерно распределяется по организму человека через систему кровообращения в течение приблизительно 2–3 ч, что означает, что все органы в организме подвергаются равномерному воздействию. Во время этого процесса 97 % НТО быстро попадает в кровоток [2]. Часть атомов трития НТО может обмениваться с атомами водорода и включаться в различные органические молекулы (азотистые основания, аминокислоты, липиды, сахара и т.д.) [3]. В отличие от НТО, органические соединения трития (ОСТ) гетерогенно распределяются в клетках и тканях, что приводит к высоким микролокальным дозам [4]. Возникающие при распаде трития низкоэнергетические  $\beta$ -частицы (средняя энергия 5,7 кэВ) обладают небольшим пробегом в воде и биологических тканях и вызывают наибольшие повреждения биологических макромолекул, в том и числе ДНК, в случае включения трития в структуру этих молекул [5, 6].

Среди широкого спектра радиационно-индуцированных повреждений ДНК двунитевые разрывы (ДР) являются наиболее критическими для дальнейшей судьбы облученной клетки. В ответ на образование ДР в клетках активируется ответ на повреждение ДНК, который включает в себя репарацию ДНК, арест клеточного цикла, запрограммированную гибель клеток и потерю способности клетки к делению [7]. В результате некорректной репарации ДНК возникают микроструктурные aberrации хромосом и различные цитогенетические нарушения (хромосомные перестройки стабильного и нестабильного типов, микроядра), тогда как невозможность репарации ведет к запуску механизмов клеточной гибели или клеточной сенесценции [8, 9]. В ответ на образование ДР в районах хроматина, фланкирующих ДР, образуются сложные динамические микроструктуры, состоящие из белков, участвующих в ответе на повреждение ДНК, с различной копийностью (до нескольких тысяч копий), получившие в литературе название фокусы повреждения ДНК или фокусы белков репарации ДНК [10]. Наиболее часто при проведении радиобиологических исследований используется анализ фокусов белков-маркеров ДР ДНК – фосфорилированного гистона H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ) и 53BP1 [11]. Оба белка играют важную роль в ответе клеток на образование ДР [12, 13].

Цель работы – сравнительное исследование изменений количества фокусов белков-маркеров ДР ДНК ( $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1) в мезенхимальных стромальных клетках (МСК) человека, инкубированных с  $^3\text{H}$ -тимидином или НТО в течение 24, 48 и 72 ч.

## Материал и методы

### Культура клеток и условия культивирования

В работе использовали первичную культуру МСК человека 5–6-го пассажа, полученную из коллекции ООО «БиолоТ» (Россия). Для экспериментов клетки культивировали в среде DMEM (1 г/л глюкозы) (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Thermo Fisher Scientific, США) в стандартных условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) в течение 3 пассажей, со сменой среды один раз в три дня.

### Инкубация клеток с соединениями трития

К питательной среде добавляли стерильный раствор  $^3\text{H}$ -тимидина или НТО с удельной активностью от 100 до 400 МБк/л и инкубировали в стандартных условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора в течение 24, 48 и 72 ч.

### Иммуноцитохимический анализ

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-X100 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  $\gamma\text{H2AX}$  (клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США) и мышинные моноклональные антитела к белку 53BP1 (клон BP13, Merck-Millipore, США) в разведении 1/200 или мышинные 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 со 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 фотовыцветания 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), оснащенный видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм возбуждение и 435–485 нм эмиссия), В-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 300 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 использовали программу DARFI (<http://github.com/varnivey/darfi>). Долю Ki67+ клеток подсчитывали вручную.

### Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборки использовали t-критерия Стьюдента. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ ).

### Результаты и обсуждение

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что инкубация 24 ч МСК с  $^3$ H-тимидином с удельной радиоактивностью 100–400 МБк/л приводит линейному увеличению количества фокусов  $\gamma$ H2AX. При этом даже при наиболее низкой радиоактивности (100 МБк/л) количество фокусов статически значимо отличалось от контрольных значений. Обращает на себя внимание, что увеличение времени инкубации с 24 ч до 72 ч не приводило к дальнейшему росту количества фокусов  $\gamma$ H2AX (рис. 1). Это можно объяснить двумя процессами: 1) снижением пролиферативной активности клеток и соответственно включения  $^3$ H-тимидина в структуру ДНК; 2) наступлением равновесия между образованием ДР и репарацией структуры ДНК.

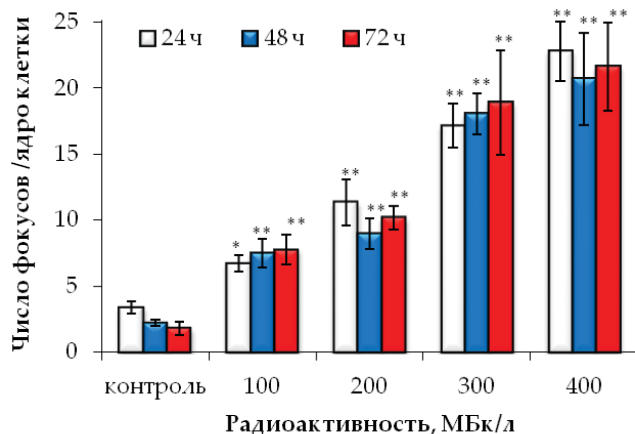


Рис. 1. Влияние  $^3$ H-тимидина на количество фокусов  $\gamma$ H2AX в культивируемых МСК человека. Результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная погрешность среднего \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  – значимость различий от контрольных значений на соответствующие точки инкубации клеток

Fig. 1. Effect of  $^3$ H-thymidine on the number of  $\gamma$ H2AX foci in cultured human MSCs. The results are presented as the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  – significance of differences from control values at the corresponding points of cell incubation

Совершенно другие результаты были получены при инкубации МСК с НТО. Было продемонстрировано, что увеличение количества фокусов  $\gamma$ H2AX отмечалось только через 24 ч инкубации (рис. 2). При этом количественный выход фокусов на единицу удельной радиоактивности был существенно ниже, чем при воздействии  $^3$ H-тимидина. Увеличение времени инкубации до 48 и

72 ч приводило к снижению количества фокусов  $\gamma$ H2AX до контрольных значений (рис. 2).

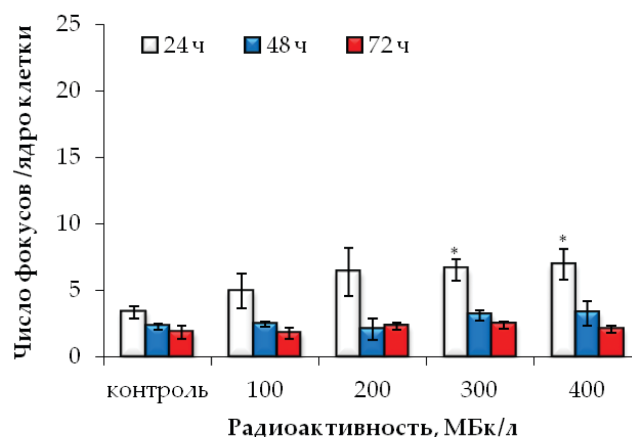


Рис. 2. Влияние НТО на количество фокусов  $\gamma$ H2AX в культивируемых МСК. Результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная погрешность среднего \*  $p < 0,05$  – значимость различий от контрольных значений на соответствующие точки инкубации клеток

Fig. 2. Effect of НТО on the number of  $\gamma$ H2AX foci in cultured MSCs. The results are presented as the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean \*  $p < 0,05$  – significance of differences from control values at the corresponding points of cell incubation

Было интересно сравнить количественный выход фокусов  $\gamma$ H2AX при инкубации клеток с  $^3$ H-тимидином и НТО. Однако наличие нелинейности при 48 и 72 ч инкубации (плато в случае  $^3$ H-тимидина и снижение эффекта в случае НТО) делает возможным проведение такого сравнения только через 24 ч инкубации, когда при воздействии обоих соединений отмечалось линейное увеличение эффекта. В эту временную точку зависимость изменений количества фокусов  $\gamma$ H2AX от удельной радиоактивности  $^3$ H-тимидина хорошо описывается линейным уравнением  $y = 2,4 + 49,30x$  ( $R^2 = 0,99$ ), где  $y$  – количество фокусов  $\gamma$ H2AX в клеточном ядре, а  $x$  – удельная радиоактивность в ГБк/л. Обращает на себя внимание очень высокий коэффициент детерминации – 0,99. Это говорит о выраженной зависимости количества фокусов  $\gamma$ H2AX от удельной радиоактивности активности  $^3$ H-тимидина в эту временную точку. Для НТО аналогичная зависимость описывается линейным уравнением  $y = 3,9 + 8,70x$  ( $R^2 = 0,88$ ), где  $y$  – количество фокусов  $\gamma$ H2AX в клеточном ядре, а  $x$  – удельная радиоактивность в ГБк/л. Однако коэффициент детерминации в этом случае значительно ниже – 0,88 и применимость линейной модели находится под вопросом. Выход ДР при воздействии НТО довольно низок, а при количественной оценке малых эффектов существенно возрастает неопределенность такой оценки.

При описании дозовых зависимостей линейными уравнениями ( $y = a + bx$ ) угловой коэффициент  $b$  отражает природу эффекта на единицу дозы. Сравнение угловых коэффициентов  $b$  двух дозовых зависимостей, полученных для разных типов воздействий, показывает насколько одно из них эффективнее другого.

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что в диапазоне удельной радиоактивности 100–400 МБк/мл количественный выход ДР ДНК в МСК при воздействии  $^3$ H-тимидина в течение 24 ч  $\sim$  в 5,7 раза выше, чем при воздействии НТО. Сходное значение этого коэффициента ( $\sim 6,5$ ) было получено нами ранее в исследовании образования ДР ДНК в МСК, культивируемых в течение 24 ч с  $^3$ H-тимидином и НТО с

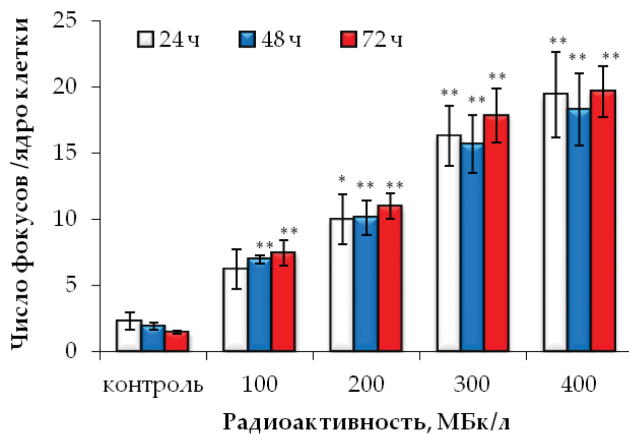


Рис. 3. Влияние <sup>3</sup>H-тимидина на количество фокусов 53BP1 в культивируемых МСК человека. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная погрешность среднего \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 – значимость различий от контрольных значений на соответствующие точки инкубации клеток

Fig. 3. Effect of <sup>3</sup>H-thymidine on the number of 53BP1 foci in cultured human MSCs. The results are presented as the arithmetic mean ± standard error of the mean \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 – significance of differences from control values at the corresponding points of cell incubation

удельной активностью 50–800 МБк/л [14]. Однако нужно понимать всю условность такого сравнения. Оно применимо только для раннего периода инкубации клеток (24 ч). Кроме того, допущение о линейном характере изменения количества фокусов γН2АХ в зависимости от удельной радиоактивности НТО требует проведения дополнительных исследований.

В качестве альтернативного маркера ДР ДНК был выбран *p*53-связывающий белок 1 (53BP1). 53BP1 способствует соединению дистальных концов ДНК при репарации ДНК и является важным регулятором клеточного ответа на образование ДР [15]. В последние годы многие исследователи полагают, что фокусы 53BP1 являются более специфическим маркером ДР ДНК по сравнению с фокусами γН2АХ [16, 17]. Поэтому представлялось весьма интересным сравнить результаты оценки фокусов γН2АХ и 53BP1.

На рис. 4 представлены результаты исследований изменений среднего количества фокусов белка 53BP1 в ядрах МСК, инкубированных с <sup>3</sup>H-тимидином в течение 24, 48 и 72 ч. Видно, что в целом характер изменений количества фокусов 53BP1 и γН2АХ сходен. Так же как и в случае γН2АХ, наблюдается линейное увеличение количества фокусов 53BP1 при инкубации 24 ч, после отмечается плато.

Картина изменений количества 53BP1 в ядрах МСК, инкубированных с НТО, также сходна с картиной изменений количества фокусов γН2АХ (рис. 5). Наблюдается увеличение количества фокусов в ранний период инкубации (24 ч), после чего следует их снижение до контрольных значений.

Анализ изменений количества фокусов 53BP1 на 24 ч инкубации показал, что в изученном диапазоне удельной радиоактивности зависимость изменений количества фокусов 53BP1 от удельной радиоактивности <sup>3</sup>H-тимидина хорошо описывается линейным уравнением  $y=2,0+44,4x$  ( $R^2=0,99$ ), где *y* – количество фокусов 53BP1 в клеточном ядре, а *x* – удельная радиоактивность в ГБк/л. Количественный выход фокусов 53BP1 на единицу удельной радиоактивности в ГБк/л несколько ниже выхода количества фокусов γН2АХ: 44,4 против 49,3, соответственно. Возможно, что это обусловлено иной

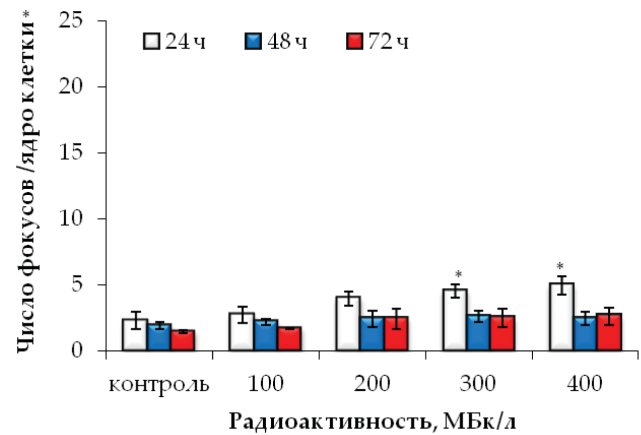


Рис. 4. Влияние НТО на количество фокусов 53BP1 в культивируемых МСК. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная погрешность среднего \**p*<0,05 – значимость различий от контрольных значений на соответствующие точки инкубации клеток

Fig. 4. Effect of HTO on the number of 53BP1 foci in cultured MSCs. The results are presented as the arithmetic mean ± standard error of the mean \**p*<0.05 – significance of differences from control values at the corresponding points of cell incubation

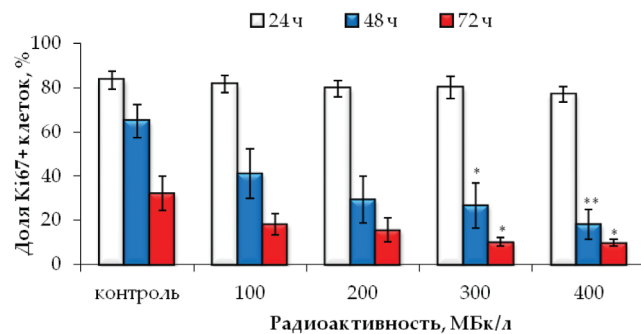


Рис. 5. Изменения доли пролиферирующих (Ki67+) мезенхимальных стволовых клеток при инкубации с <sup>3</sup>H-тимидином. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартная погрешность среднего \**p*<0,05, \*\**p*<0,01 – значимость различий от контрольных значений на соответствующие точки инкубации клеток.

Fig. 5. Changes in the proportion of proliferating (Ki67+) mesenchymal stem cells upon incubation with <sup>3</sup>H-thymidine. The results are presented as the arithmetic mean ± standard error of the mean \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 – significance of differences from control values at the corresponding points of cell incubation

специфичностью и/или разным временем полужизни этих структур.

Для НТО зависимость описывается линейным уравнением  $y=2,3+7,1x$  ( $R^2=0,96$ ), где *y* – количество фокусов 53BP1 в клеточном ядре, а *x* – удельная радиоактивность в ГБк/л. В этом случае количественный выход фокусов 53BP1 на единицу удельной радиоактивности в ГБк/л близок к количественному выходу фокусов γН2АХ: 7,1 и 8,7 соответственно. И хотя коэффициент детерминации для уравнения, описывающего выход фокусов 53BP1 выше, чем в случае γН2АХ, угол наклона кривой очень мал.

В целом результаты исследований свидетельствуют о том, что количественный анализ фокусов белков γН2АХ и 53BP1 дает близкие значения. При воздействии <sup>3</sup>H-тимидина в течение 24 ч в МСК индуцируется ~ в 6 раз (5,7 и 6,3 при анализе γН2АХ и 53BP1, соответственно) больше ДР ДНК по сравнению с воздействием НТО.

Интенсивность включения соединений трития в живые клетки существенно зависит от их пролиферативной

активности. В пролиферирующих клетках идет активный синтез биологических молекул (ДНК, РНК, белки) и резко увеличивается включение трития в органические соединения. Также в популяциях активно пролиферирующих клеток высока доля клеток в стадии синтеза ДНК (S-фаза), во время которой происходит встраивание меченных тритием нуклеотидов, в частности  $^3\text{H}$ -тимидина, в структуру ДНК. Поэтому для корректной интерпретации результатов анализа фокусов белков репарации ДНК было важно оценить изменения доли пролиферирующих клеток во время их 72 ч инкубации с соединениями трития и без них (контроль). В качестве маркера клеточной пролиферации был выбран белок Ki67. Этот белок синтезируется только в делящихся клетках, с максимумом в G2/M фазах, и отсутствует в покоящихся клетках [18].

Результаты оценки доли пролиферирующих МСК в контрольных образцах показали, что с увеличением времени культивирования происходит существенное уменьшение доли пролиферирующих клеток с  $83,4 \pm 4,0\%$  на 24 ч до  $32,3 \pm 7,6\%$  на 72 ч (рис. 5). При этом реальное время культивирования клеток необходимо для каждой временной точки увеличить на 24 ч, так как соединения трития были добавлены через 24 ч после пассирования клеток в чашки Петри. Время удвоения популяции МСК костного мозга человека в среднем составляет 30–33 ч [19, 20]. Поэтому уже к 48-му ч эксперимента (+ 24 ч прекультивирования) клеточные популяции из-за контактного ингибирования пролиферации переходят из стадии экспоненциального роста к стационарной стадии (плато), во время которой клетки не делятся. Выбор такой экспериментальной модели (клеточная популяция на различных стадиях роста) позволяет оценить действие соединений трития после их включения в клеточные структуры.

Из данных, представленных на рис. 5, видно, что  $^3\text{H}$ -тимидин снижает пролиферативную активность клеток начиная с инкубации 48 ч. Такая инкубация с  $^3\text{H}$ -тимидином с удельной радиоактивностью 300 МБк/л снижает долю Ki67 позитивных клеток примерно в 2,5 раза (с 65 до 27 %,  $p=0,04$ ), а инкубация в среде с удельной радиоактивностью 400 МБк/л – уже в 3,6 раза (с 65 до 18 %,  $p=0,01$ ). К инкубации 72 ч эффект ингибирования пролиферации  $^3\text{H}$ -тимидином сохраняется (рис. 5).

На рис. 6 представлены результаты исследований изменения пролиферативной активности МСК при инкубации в культуральной среде с НТО с различной удельной радиоактивностью. Видно, что НТО с удельной радиоактивностью 100–400 МБк/л не влияет на пролиферативную активность культивируемых МСК.

В целом представленные результаты свидетельствуют о том, что при инкубации 72 ч клеток с соединениями трития наибольшая пролиферативная активность наблюдается на 24 ч после чего отмечается снижение пролиферативной активности вследствие контактного ингибирования клеточного роста.  $^3\text{H}$ -тимидин усиливает этот процесс ингибирования клеточной пролиферации, тогда как НТО в исследованном диапазоне удельной радиоактивности практически не влияет на него.

Таким образом, проведенные исследования в очередной раз свидетельствуют о том, что тритий представляет наибольшую опасность при включении в органические молекулы, в особенности в ДНК. Остаются вопросы о механизмах образования ДР ДНК при воздействии НТО.

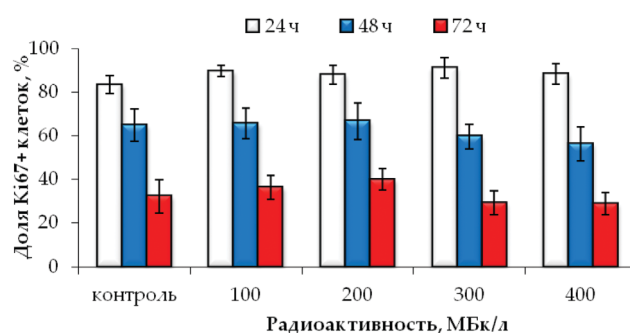


Рис. 6. Изменения доли пролиферирующих (Ki67+) мезенхимальных стволовых клеток при инкубации с НТО. Результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная погрешность среднего \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  – значимость различий от контрольных значений на соответствующие точки инкубации клеток

Fig. 6. Changes in the proportion of proliferating (Ki67+) mesenchymal stem cells upon incubation with НТО. The results are presented as the arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  – significance of differences from control values at the corresponding points of cell incubation

Тот факт, что увеличение ДР при инкубации клеток с НТО наблюдалось только в пролиферирующих клетках, позволяет предположить, что эти ДР были индуцированы опосредованно в результате коллапса репликативных вилок. Повышенная генерация активных форм кислорода и азота, индуцирующих свободно-радикальные повреждения ДНК, может приводить в клетках в фазе синтеза ДНК к увеличению частоты ошибок репликации ДНК. Важно подчеркнуть, что репарация таких метаболических ДР, образующихся в результате коллапса репликативных вилок, осуществляется как правило по корректному механизму гомологичной рекомбинации. То есть образование метаболических ДР не приводит к серьезным последствиям для клетки, в отличие от прямых радиационно-индуцированных ДР.

### Выводы

Инкубация МСК с  $^3\text{H}$ -тимидином с удельной радиоактивностью 100–400 МБк/л в первые 24 ч приводит к дозозависимому увеличению фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1. При дальнейшем увеличении времени инкубации до 48 ч и 72 ч наблюдается эффект насыщения – количество фокусов выходит на плато. Эффект плато на инкубации 48 ч и 72 ч обусловлен 2 процессами: 1) снижением пролиферативной активности клеток и соответственно включения  $^3\text{H}$ -тимидина в структуру ДНК; 2) наступлением равновесия между образованием и репарацией ДР ДНК.

1. Статистически достоверное увеличение фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1 в МСК инкубированных с НТО, наблюдалось только в активно пролиферирующих клетках в первые 24 ч инкубации в среде с удельной радиоактивностью 300 и 400 МБк/л, после чего со снижением пролиферативной активности снижалось до контрольных значений.
2. Расчеты, выполненные на основе полученных в ходе работы результатов количественного анализа фокусов  $\gamma\text{H2AX}$  и 53BP1 после 24 ч инкубации МСК с соединениями трития, показали, что при воздействии  $^3\text{H}$ -тимидина индуцируется  $\sim$  в 6 раз больше ДР ДНК, чем при воздействии НТО.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Гурьев Д.В., Кочетков О.А., Барчуков В.Г., Осипов А.Н. Биологические эффекты органических и неорганических соединений трития // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020. Т.65, № 2. С. 5-10. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-2-5-10>. [Guryev D.V., Kochetkov O.A., Barchukov V.G., Osipov A.N. Biological Effects of Organic and Inorganic Compounds of the Tritium. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65;2:5-10. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-2-5-10> (In Russ.)].
2. Little M.P., Lambert B.E. Systematic Review of Experimental Studies on the Relative Biological Effectiveness of Tritium. *Radiat Environ Biophys*. 2008;47;1:71-93. doi: 10.1007/s00411-007-0143-y.
3. Kim S.B., Baglan N., Davis P.A. Current Understanding of Organically Bound Tritium (OBT) in the Environment. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2013;126:83-91. doi: 10.1016/j.jenvrad.2013.07.011.
4. Harrison J.D., Khursheed A., Lambert B.E. Uncertainties in Dose Coefficients for Intakes of Tritiated Water and Organically Bound Forms of Tritium by Members of the Public. *Radiation Protection Dosimetry*. 2002;98;3:299-311.
5. Alloni D., Cutaia C., Mariotti L., Friedland W., Ottolenghi A. Modeling Dose Deposition and DNA Damage Due to Low-Energy Beta(-) Emitters. *Radiation Research*. 2014;182;3:322-330. doi: 10.1667/RR13664.1.
6. Rodneva S.M., Osipov A.A., Guryev D.V., Tsishnatti A.A., Fedotov Y.A., Yashkina E.I., et al. Comparative Study of the  $\gamma$ H2AX Foci Forming in Human Lung Fibroblasts Incubated in Media Containing Tritium-Labeled Thymidine or Amino Acids. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;172;2:245-9. doi: 10.1007/s10517-021-05370-6.
7. Mladenova V., Mladenov E., Stuschke M., Iliakis G. DNA Damage Clustering after Ionizing Radiation and Consequences in the Processing of Chromatin Breaks. *Molecules*. 2022;27;5. doi: 10.3390/molecules27051540.
8. Jiang Y. Contribution of Microhomology to Genome Instability: Connection between DNA Repair and Replication Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23;21. doi: 10.3390/ijms232112937.
9. Sishc B.J., Davis A.J. The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9;7. doi: 10.3390/cancers9070081.
10. Rothkamm K., Barnard S., Moquet J., Ellender M., Rana Z., Burdak-Rothkamm S. DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environ Mol. Mutagen*. 2015;56;6:491-504. doi: 10.1002/em.21944.
11. Bushmanov A., Vorobyeva N., Molodtsova D., Osipov A.N. Utilization of DNA Double-Strand Breaks for Biodosimetry of Ionizing Radiation Exposure. *Environmental Advances*. 2022;8:100207. doi: 10.1016/j.envadv.2022.100207.
12. Scully R., Xie A. Double Strand Break Repair Functions of Histone H2AX. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2013;750;1-2:5-14. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007.
13. Shibata A., Jeggo P.A. Roles for 53BP1 in the Repair of Radiation-Induced DNA Double Strand Breaks. *DNA Repair*. 2020;93:102915. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102915.
14. Vorob'eva N.Y., Kochetkov O.A., Pustovalova M.V., Grekhova A.K., Blokhina T.M., Yashkina E.I., et al. Comparative Analysis of the Formation of  $\gamma$ H2AX Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to 3H-Thymidine, Tritium Oxide, and X-Rays Irradiation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;166;1:178-181. doi: 10.1007/s10517-018-4309-1.
15. Bártová E., Legartová S., Dundr M., Suchánková J. A Role of the 53BP1 Protein in Genome Protection: Structural and Functional Characteristics of 53BP1-Dependent DNA Repair. *Aging*. 2019;11;8:2488-2511. doi: 10.18632/aging.101917.
16. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):7-18. doi: 10.1038/nrm3719.
17. Markova E., Vasilyev S., Belyaev I. 53BP1 Foci as a Marker of Tumor Cell Radiosensitivity. *Neoplasma*. 2015;62;5:770-776. doi: 10.4149/neo\_2015\_092.
18. Niotis A., Tsiambas E., Fotiades P.P., Ragos V., Polymeneas G. ki-67 and Topoisomerase IIa Proliferation Markers in Colon Adenocarcinoma. *J. BUON*. 2018;23;7:24-27.
19. Mennan C., Garcia J., Roberts S., Hulme C., Wright K. A Comprehensive Characterisation of Large-Scale Expanded Human Bone Marrow and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10;1:99. doi: 10.1186/s13287-019-1202-4.
20. Guo Z., Yang J., Liu X., Li X., Hou C., Tang P.H., et al. Biological Features of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2001;114;9:950-953.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 22-2400490).

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.01.2022. Принята к публикации: 25.02.2023.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The work was carried out with the support of the RGNF (project No. 22-2400490).

**Contribution.** Article was prepared with equal participation of the authors.

**Article received:** 20.01.2022. Accepted for publication: 25.02.2023.