

УДК 613.6.027

ОЦЕНКА АССОЦИАЦИИ СТЕПЕНИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК И ЧАСТОТЫ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОДНОКРАТНОМ ОБЛУЧЕНИИ КРОВИ *in vitro*

© 2023 г. О. С. Цымбал¹, *, Д. С. Исубакова¹, Е. В. Брониковская¹, А. Ф. Николаева², В. О. Сигин², А. И. Калинин², Ж. А. Старцева³, Н. В. Литвяков^{1,3}, И. В. Мильто^{1,4}, Р. М. Тахауов^{1,4}

¹Северский биофизический научный центр Федерального медико-биологического агентства, Томская обл., Северск, 636013 Россия

²Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

³Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

⁴Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: olga-tsymbal@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2023 г.

После доработки 30.05.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

Наиболее чувствительной к радиационному воздействию биомолекулой является ДНК, повреждение которой проявляются, в том числе, в виде хромосомных aberrаций (ХА). Метилирование ДНК участвует в регуляции экспрессии генов, репликации, репарации ДНК и др. Изменение процессов метилирования ДНК подвержено воздействию γ -излучения. Цель исследования – оценить связь степени метилирования ДНК и частоты ХА после острого облучения *in vitro* лимфоцитов крови человека γ -излучением. В исследовании приняли участие десять условно здоровых работников Сибирского химического комбината, в лимфоцитах крови которых оценивали степень метилирования CpG-динуклеотидов (широкогеномное бисульфитное секвенирование, XmaI-Reduced representation bisulfite sequencing – XmaI-RRBS) и частоту ХА (цитогенетическое исследование) после острого облучения крови *in vitro* в дозе 1.5 Гр. Выявили, что острое облучение крови γ -излучением привело к увеличению в лимфоцитах частоты aberrантных клеток, дицентрических хромосом, хроматидных и хромосомных фрагментов. Корреляционный анализ статуса метилирования CpG-динуклеотидов и частоты ХА выявил изменения степени метилирования 97 генов, которые с высокой силой положительно (56 генов) или отрицательно (41 ген) связаны с повышенной частотой ХА. В ходе широкогеномного скрининга генов, метилирование которых коррелирует с повышенной частотой ХА, выявлены гены, перспективные в качестве потенциальных маркеров радиационного воздействия и изучения механизмов формирования радиочувствительности организма, а также радиорезистентности опухолей при лучевой терапии.

Ключевые слова: метилирование ДНК, хромосомные aberrации, острое облучение, γ -излучение, лимфоциты крови, широкогеномное бисульфитное секвенирование (XmaI-RRBS).

DOI: 10.31857/S0016675823110152, EDN: NGTOJL

Ионизирующее излучение (ИИ) охватывает разные сферы деятельности человека: медицина, производство электро- и тепловой энергии, военная промышленность и др. Последствия радиационного воздействия проявляются на организменном и клеточно-молекулярном уровнях. Наиболее чувствительной к воздействию ИИ является молекула ДНК, изменение структуры которой приводит к различным генным, хромосомным и геномным нарушениям [1]. Признанной моделью для выявления повреждений ДНК является анализ хромосомных aberrаций (ХА) лимфоцитов крови [2]. Широко распространено изучение спектра и

частоты ХА после воздействия разного по продолжительности γ -излучения. Исследования острого [3–6] и хронического [7, 8] воздействия ИИ на организм и клетки человека показали, что частота ХА возрастает с увеличением дозы облучения, но в диапазоне “малых” доз эта зависимость имеет нелинейный характер [9]. Изучение влияния “малых” доз (менее 0.1 Гр) на организм человека после компьютерной томографии [10] показало, что количество дицентрических и кольцевых хромосом в соматических клетках увеличивается, при этом следует отметить значи-

тельную индивидуальную изменчивость этого показателя.

ИИ также влияет на эпигенетические процессы, из которых особый интерес представляет метилирование ДНК. Степень метилирования ДНК — довольно чувствительный показатель, на который могут оказывать влияние экзогенные и эндогенные факторы. Например, окислительный стресс вызывает подавление транскрипции генов-супрессоров опухоли посредством гиперметилирования ДНК и, наоборот, активация онкогенов путем деметилирования ДНК приводит к инициации канцерогенеза [11]. Хроническое воздействие ИИ приводит к аберрантному метилированию CpG-островков промоторов генов [12], которое имеет дозозависимый характер и сохраняется в течение нескольких лет после длительного внешнего (γ -излучение) и комбинированного (α - и γ -излучения) облучения [13]. В другом исследовании, наоборот, отмечается в большей степени гипометилирование CpG-островков, которое также сохраняется после острого облучения ИИ в дозе 1 Гр [14].

Исследование радиационного воздействия на организм человека показало связь степени метилирования ДНК и высокой частоты ХА. Y. Lee и соавт. [15] у работников объектов использования атомной энергии выявили глобальное снижение степени метилирования ДНК, по сравнению с контрольной группой. При этом низкая степень глобального метилирования ДНК коррелировала с высокой частотой ХА [15]. Нами было определено, что степень метилирования *Bak1* в лимфоцитах крови работников Сибирского химического комбината (СХК) связана с дозой облучения и повышенной частотой хроматидных (непарных) фрагментов [16]. Также выявлена отрицательная корреляция степени метилирования промоторов генов апоптоза с дозой внешнего облучения (*HRK*, *BAD*, *BID*), повышенной частотой аберрантных клеток (*BAX*) и дицентрических хромосом (*APAF1*) [17].

Таким образом, целью настоящего исследования является оценка связи степени метилирования ДНК и повышенной частоты ХА лимфоцитов при однократном облучении ИИ крови *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено десять условно здоровых мужчин — работников СХК, в возрасте от 18 до 34 лет, которые не подвергались радиационному воздействию и не страдали хроническими заболеваниями. От каждого донора было получено добровольное информированное согласие на сбор биоматериала (цельной крови) и обработку персональных данных.

Материалом для исследования являлась венозная кровь. После получения кровь от каждого

донора была разделена на две части — контрольная и экспериментальная образцы (контрольная и экспериментальная группы соответственно). Экспериментальные образцы подвергались однократному воздействию γ -излучения *in vitro* в дозе 1.5 Гр. Облучение крови проводили с помощью γ -терапевтического аппарата Theratron Equinox (Канада), предназначенного для дистанционного облучения (радиоактивный источник ^{60}Co , мощность дозы 1.93 Гр/мин, $E_{\gamma} \approx 1.25$ МэВ). Облучение и культивирование образцов обеих групп осуществляли в день получения крови. После культивирования в лимфоцитах крови оценивали спектр и частоту ХА, а также степень метилирования ДНК.

Культивирование. Культивирование образцов цельной крови контрольной и экспериментальной групп проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного шкафа (Kojair, Финляндия). Кровь в объеме 4 мл смешивали с 16 мл питательной среды RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), с предварительно добавленным L-глутамином (ПанЭко, Россия), 4 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия) и 0.4 мл фитогемагглютина (ПанЭко, Россия). После чего кровь инкубировали в культуральных флаконах при 37°C в орбитальном шейкере-инкубаторе (Biosan Sia, Латвия) в течение 48 ч.

Из культурального флакона каждого образца за 1.5 ч до окончания инкубации половину культуральной суспензии отбирали в две отдельные пробирки, которые затем использовали для выделения ДНК и бисульфитного секвенирования. К оставшейся в культуральных флаконах суспензии добавляли 180 мкл колхицина (ПанЭко, Россия) и продолжали культивирование 1.5 ч при 37°C.

Выделение ДНК и метод ХmAI-RRBS. Обе пробирки с культуральной суспензией (без колхицина) центрифугировали в течение 6 мин при 1500 об./мин (Eppendorf Centrifuge 5702R, Германия) и трижды отмывали физиологическим раствором для удаления гепарина. Осадок пипетировали и алиquotировали в пробирки типа эппендорф по 700 мкл, затем замораживали (-80°C).

Выделение ДНК из лимфоцитов крови проводили с использованием набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя, после предварительной промывки замороженных образцов 1-кратным SSC (saline sodium citrate — смесь хлорида натрия и цитрата натрия).

Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, США).

Степень метилирования ДНК в образцах контрольной и экспериментальной групп определяли бисульфитным секвенированием ограниченного набора геномных локусов — RRBS (reduced

representation bisulfite sequencing) с использованием фермента рестрикции XmaI (метод XmaI-RRBS) [18, 19]. Секвенирование геномных библиотек XmaI-RRBS осуществляли с использованием Ion Personal Genome Machine (PGM), набора для секвенирования Ion PGM 200 Sequencing Kit и Ion 318 Chip (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию геномных библиотек измеряли с использованием флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Цитогенетический метод. После 48-часовой инкубации в культуральную суспензию (с колхицином) добавляли 0.56%-ный раствор KCl. Процесс гипотонизации длился 45 мин при 37°C. Полученную суспензию фиксировали 3%-ной уксусной кислотой, затем смесью этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1. После отмывки фиксатором и осветления раствора суспензию наносили на предметные стекла и окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, Россия), растворенным в фосфатном буфере. Цитогенетический анализ был проведен на микроскопе Leica DM2500 (Leica, Германия; увеличение $\times 1000$) у 20 образцов (10 образцов контрольной и 10 образцов экспериментальной групп). У каждого образца оценивали минимум 300 метафазных пластинок на наличие ХА. Учитывали общее количество aberrантных клеток, а также хроматидные и хромосомные фрагменты, хроматидные обмены, кольцевые и дицентрические хромосомы, полиплоидные и мультиабберрантные (имеющие более пяти ХА) клетки.

Обработка полученных результатов. Данные секвенирования обрабатывали с использованием стандартного программного обеспечения Ion Torrent Suite™. С помощью программного пакета Bismark 0.20 выполняли выравнивание обработанных бисульфитом натрия прочтений и получение данных о метилированных и неметилированных цитозинах. Дифференциально метилированные цитозины отбирали из данных XmaI-RRBS с использованием пакета ROTS (reproducibility-optimized test statistic) с возможностью парного тестирования [20]. Расчеты проводили с использованием статистического языка программирования R 3.6.3 [21].

Результаты цитогенетического исследования выражали в виде частоты aberrантных клеток и различных типов ХА на 100 клеток (метафазных пластинок). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft, США). Для оценки статистически значимых различий между группами использовался U-критерий Манна-Уитни.

Для оценки связи частоты ХА и степени метилирования генов (*b*-value) каждого образца экспе-

риментальной группы использовали коэффициент корреляции Спирмена. Положительной или отрицательной корреляцией высокой силы считали значения от ± 0.7 до ± 1 , в соответствии со шкалой Чеддока. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (gene ontology, далее GO) был выполнен с использованием пакета clusterProfiler функцией enrichGO. В качестве предельного значения для дифференциально метилированных цитозинных было установлено изменение среднего значения метилирования *b*-value на ± 0.20 (20%) между контрольной и экспериментальной группами. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитогенетический анализ

Цитогенетический анализ, проведенный для обеих групп, показал, что облучение *in vitro* в дозе 1.5 Гр приводит к увеличению частоты aberrантных клеток, хроматидных и хромосомных фрагментов, а также дицентрических хромосом (табл. 1). Повышение частоты кольцевых хромосом в экспериментальной группе находится на уровне тенденции ($p = 0.064$). Мультиабберрантные клетки были исключены из анализа, поскольку не обнаружены в образцах обеих групп.

Корреляция среднего значения степени метилирования ДНК (*b*-value) с частотой ХА

Корреляционный анализ среднего значения степени метилирования генов и частоты ХА в образцах экспериментальной группы выявил 56 генов (*PPM1J*, *BCAN*, *GNPAT*, *DMBX1*, *C1orf87*, *LRRC37A6P*, *SLC16A9*, *TSPAN15*, *NPFFR1*, *ODF3*, *SMTNL1*, *STX3*, *C11orf80*, *DTX1*, *PGAM5*, *ATP11A*, *ATP12A*, *CCDC169-SOHLH2*, *HTR2A*, *PSMC1*, *FAN1*, *C2CD4A*, *CPLX3*, *ANPEP*, *CIB1*, *RHBDF1*, *TK2*, *FAM173A*, *COTL1*, *SPG7*, *MIR22HG*, *SLC25A52*, *CCDC159*, *WIZ*, *THEG5*, *MICOS13*, *CLEC4G*, *MZT2B*, *METTL21A*, *ANKMY1*, *LGALS1*, *BCL2L1*, *TXNRD2*, *SFMBT1*, *SMAD1*, *PIGG*, *CTNND2*, *FGF18*, *PAIP1*, *HACE1*, *HCG11*, *PKD1L1*, *ADCY8*, *DMRT1*, *LOC100129316* и *NUDT11*), у которых значение *b*-value положительно, с высокой силой, коррелировало с повышенной частотой различных типов ХА. Среднее значение степени метилирования 41 гена (*RBP7*, *CLCNKB*, *ZNF695*, *TTC39A*, *NET1*, *SIK2*, *C11orf44*, *TNKS1BP1*, *AP5B1*, *EFEMP2*, *ZNF839*, *SLC25A21*, *MPI*, *RFWD3*, *DOC2B*, *IMPA2*, *SMAD2*, *ZNF236-DT*, *VSTM2B*, *APBA3*, *PSG3*, *TMEM160*, *GAD1*, *ACSL3*, *HJURP*, *ZNF2*, *ADRA2B*, *FOXA2*, *FRG1BP*, *CHAF1B*, *AATBC*, *BID*, *PRR14L*, *SLC6A11*, *CRIPAK*, *HELT*, *SLC25A48*, *STC2*, *TCPI0*, *ODF2* и *RNF224*) отрицательно, с высокой силой, коррелировало с повышенной частотой ХА. Перечень топ-10 генов, среднее зна-

Таблица 1. Спектр и частота ХА лимфоцитов крови при остром облучении γ -излучением *in vitro* крови работников СХК

| Тип ХА | Частота ХА на 100 клеток, Ме ($Q_{25}; Q_{75}$) | | Уровень значимости, <i>p</i> |
|--------------------------|---|---|------------------------------|
| | контрольная группа, 0 Гр (<i>n</i> = 10) | экспериментальная группа, 1.5 Гр (<i>n</i> = 10) | |
| Аберрантные клетки | 1.954 (1.329; 2.365) | 6.181 (5.611; 6.803) | 0.0002 |
| Хроматидные фрагменты | 0.660 (0.327; 0.974) | 1.570 (0.952; 1.987) | 0.0257 |
| Хромосомные фрагменты | 0.802 (0.331; 1.307) | 1.794 (1.650; 4.923) | 0.0073 |
| Кольцевые хромосомы | 0.000 (0.000; 0.000) | 0.165 (0.000; 0.345) | 0.0640 |
| Дицентрические хромосомы | 0.312 (0.000; 0.327) | 2.397 (1.980; 2.721) | 0.0002 |
| Хроматидные обмены | 0.000 (0.000; 0.000) | 0.000 (0.000; 0.000) | 0.7337 |
| Полиплоидные клетки | 0.000 (0.000; 0.000) | 0.000 (0.000; 0.000) | 0.6776 |

Примечание. Ме – медиана; ($Q_{25}; Q_{75}$) – межквартильный интервал; *p* – уровень статистической значимости; полужирным шрифтом выделены статистически значимые отличия.

Таблица 2. Гены, среднее значение степени метилирования (*b*-value) которых положительно коррелирует с повышенной частотой ХА у образцов экспериментальной группы (1.5 Гр)

| Тип ХА | Гены (топ-10) | Суммарное количество генов |
|--------------------------|--|----------------------------|
| Аберрантные клетки | <i>CLEC4G, DMBX1, PGAM5, CCDC169-SOHLH2, RHBDF1, SFMBT1, PKD1L1, LOC100129316, NUDT11, PCBP1-AS1</i> | 269 |
| Хроматидные фрагменты | <i>NPPFR1, SLC25A52, WIZ, SMAD1, HCG11, DMRT1, C1orf87, ATP12A, CPLX3, TK2</i> | 331 |
| Хромосомные фрагменты | <i>HTR2A, ANPEP, THEG5, SFMBT1, CTNND2, MOV10, TMEM38A, GPAAI, ODF3, LGALS1</i> | 342 |
| Кольцевые хромосомы | <i>FAM173A, GNPAT, LRRC37A6P, SLC16A9, STX3, C11orf80, CCDC159, MICOS13, MZT2B, METTL21A</i> | 436 |
| Дицентрические хромосомы | <i>SMTNL1, CIB1, ADCY8, PPM1J, BCAN, DMBX1, TSPAN15, DTX1, HTR2A, PSMC1</i> | 370 |

Примечание. Перечень топ-10 генов включает гены, корреляция которых составляет от +0.7 до +1.0.

чение степени метилирования которых показало положительную и отрицательную корреляцию высокой силы с повышенной частотой ХА, представлен в табл. 2 и 3 соответственно.

Анализ GO биологических процессов показал, что гены, метилирование ДНК которых положительно коррелирует с повышенной частотой ХА, в основном участвуют в пролиферации половых клеток, организации внутренней мембраны митохондрий, проникновении вируса в клетки, регуляции локализации белка на плазматической мембране и организации плазмолеммы, регуляции сужения сосудов и ангиогенеза, а также в различных клеточных реакциях и процессах развития. В свою очередь, гены, метилирование которых отрицательно коррелирует с повышенной частотой ХА, участвуют в транспорте кофакторов ферментов, регуляции концентрации и секреции гормонов, реакции на воздействие ИИ, регуляции перехода G1/S клеточного цикла, регуляции

транскрипции и др. На рис. 1 показаны топ-20 биологических процессов для генов, значение метилирования ДНК которых положительно и отрицательно коррелирует с повышенной частотой ХА.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ спектра и частоты ХА широко используется для оценки радиационного воздействия, маркерами которого являются дицентрические и кольцевые хромосомы (нестабильный тип ХА), а также транслокации (стабильный тип ХА), сохраняющиеся длительное время после облучения [22].

В настоящем исследовании, после облучения крови *in vitro* частота аберрантных клеток и нестабильных типов ХА (хроматидные и хромосомные фрагменты, дицентрические хромосомы) увеличивается, что также наблюдалось в других исследованиях. О.Г. Чердиченко и Е.Г. Губицкая [23]

Таблица 3. Гены, среднее значение степени метилирования (b -value) которых отрицательно коррелирует с повышенной частотой ХА у образцов экспериментальной группы (1.5 Гр)

| Тип ХА | Гены (топ-10) | Суммарное количество генов |
|--------------------------|---|----------------------------|
| Аберрантные клетки | <i>PHRF1, R3HDM1, CLGN, VEGFA, SCRNI, SIK2, ACADS, CAMKK2, LARPIB, LENEPI</i> | 305 |
| Хроматидные фрагменты | <i>PUS1, ZNF385A, ZFYVE1, HERC2, NEO1, ACD, EPB41L3, DAPK3, GFPT1, SNAP25-AS1</i> | 401 |
| Хромосомные фрагменты | <i>UBE2J2, AK5, COTL1, CLPTMIL, ZNF282, ANGPT1, ZNF33B, HAUS1, CPT1C, LOC389765</i> | 275 |
| Кольцевые хромосомы | <i>ATF3, ABCB10, PER3, IFIT5, SRGAP1, DNM1P35, PIP4K2B, NT5C3B, ZBTB7A, ZDHHC8</i> | 342 |
| Дицентрические хромосомы | <i>PHRF1, DAZAP1, ZNF142, RALGAPB, TTC39A, CCDC6, ACADS, SCN4A, TEX2, FAM20A</i> | 313 |

Примечание. Перечень топ-10 генов включает гены, корреляция которых составляет от -0.7 до -1.0 .

отмечали, что наибольший вклад в ХА вносили транслокации, дицентрические и кольцевые хромосомы, частота которых повышалась с увеличением дозы облучения. И.И. Пелевина и соавт. [4] показали, что увеличение количества аберрант-

ных клеток и ХА линейно зависит от дозы облучения. Увеличение частоты хроматидных фрагментов, наблюдавшееся также при остром [4] и хроническом [9] облучении ИИ, способствовало увеличению количества аберрантных клеток после

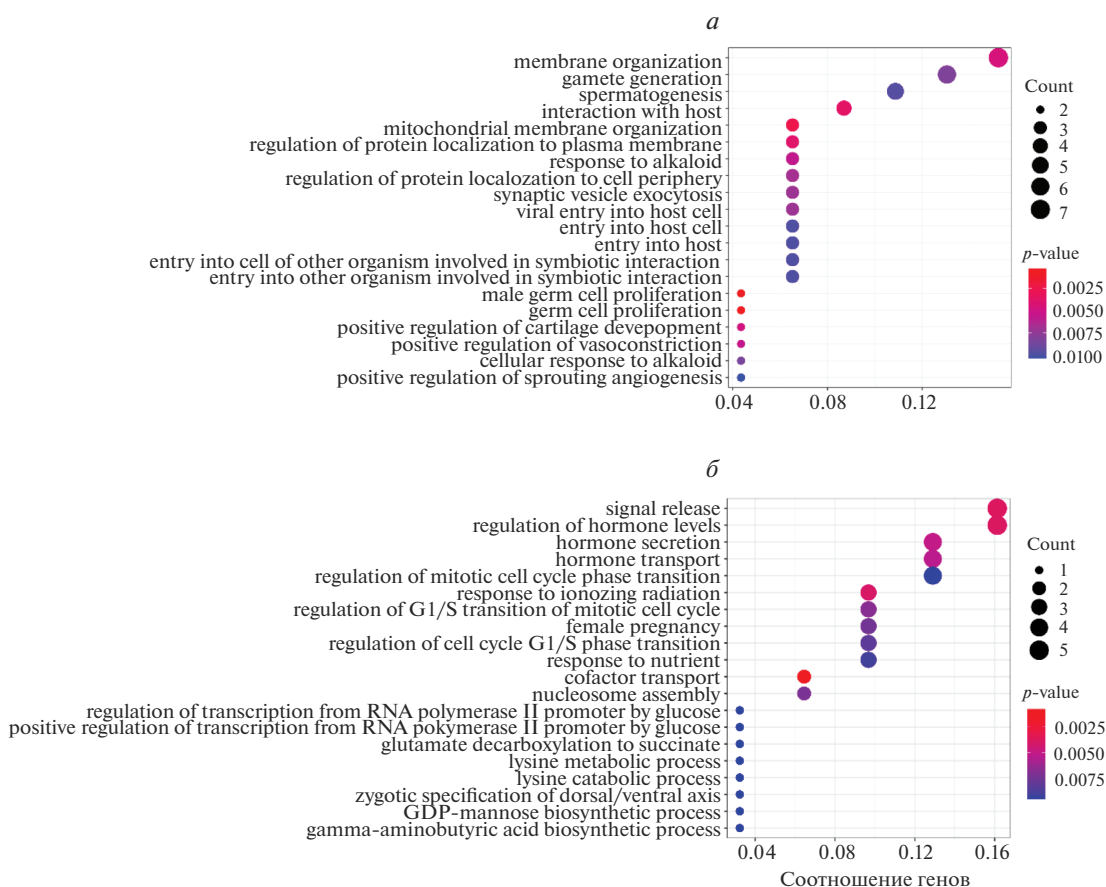


Рис. 1. Топ-20 биологических процессов онтологии генов (GO) с положительной (а) и отрицательной (б) корреляцией среднего значения метилирования (b -value) с частотой ХА в образцах экспериментальной группы. Count — число выявленных генов, которые участвуют в биологическом процессе.

воздействия γ -излучения в дозе 1.5 Гр. Однако радиогенное происхождение хроматидных фрагментов дискуссионно [24].

Корреляция степени метилирования ДНК с частотой ХА. Для исследования участия генов, которые с высокой силой, положительно и отрицательно коррелируют с повышенной частотой ХА в образцах экспериментальной группы, был проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности GO. Положительно коррелирующие гены перепредставлены в следующих процессах: пролиферация мужских половых клеток, пролиферация клеток зародыша, организация мембран, проникновение вируса, регуляция сужения сосудов и др., что может свидетельствовать об участии этих генов в таких заболеваниях как мужское бесплодие, сердечно-сосудистые и вирусные инфекционные.

Было отмечено, что *FAN1*, степень метилирования которого положительно коррелирует с повышенной частотой ХА, участвует в реакции на повреждение ДНК и репарации как одноцепочечных, так и двухцепочечных повреждений ДНК [25]. Гипометилирование промотора этого гена и снижение экспрессии *FAN1* отмечалось при патологиях плаценты [26].

Из генов, которые отрицательно коррелируют с повышенной частотой ХА после облучения, представляют интерес *NET1*, *TNKS1BP1* и *RFWD3*, поскольку эти гены принимают участие в восстановлении повреждений двухцепочечной ДНК и межцепочечных перекрестных связей ДНК после воздействия ИИ. Например, белок *NET1* активирует ядерный белок RhoA, который контролирует многие клеточные процессы, включая выживание клеток, экспрессию генов и миграцию. ИИ способствует активации ядерного пула RhoA *NET1*-зависимым способом в ответ на повреждение ДНК [27]. Благодаря нашему исследованию становится понятным механизм активации ядерного пула RhoA в ответ на воздействие ИИ, показанный A.D. Dubash и соавт. [27], он происходит за счет гипометилирования *NET1*. Поскольку система RhoA является драйвером развития рака и участвует в резистентности и прогрессии опухоли [28], ее активация под действием лучевой терапии за счет гипометилирования *NET1* может обуславливать радиорезистентность многих опухолей. Белок *TNKS1BP1* активируется в ответ на воздействие ИИ, взаимодействует с ДНК-зависимой протеинкиназой и поли(АДФ-рибоза) полимеразой 1 (*PARP-1*), что приводит к эффективной репарации двухцепочечных разрывов ДНК [29]. *RFWD3* участвует в репликации, обеспечивает успешную гомологичную рекомбинацию двухцепочечных разрывов ДНК после воздействия ИИ, что повышает радиочувствительность клеток [30].

Интерес представляет также *BID*, средняя степень метилирования которого сильно и отрицательно коррелирует с повышенной частотой ХА (хроматидные фрагменты). Проведенное нами ранее исследование выявило только отрицательную корреляцию степени метилирования этого гена с дозой внешнего облучения [17]. Других исследований ассоциации степени метилирования *BID* и частоты ХА не обнаружено.

Таким образом, проведен широкогеномный скрининг генов, метилирование которых коррелирует с повышенной частотой ХА после острого облучения γ -излучением *in vitro*. Корреляцию степени метилирования ДНК с частотой ХА проявили 97 генов, из которых положительная корреляция высокой силы отмечалась у 56 генов, а отрицательная — у 41 гена. Эти гены участвуют в важных клеточных процессах, таких как репарация и репликация ДНК, регуляция экспрессии генов, пролиферация, рост, дифференцировка клеток и др. На гены *NET1*, *TNKS1BP1*, *RFWD3* и *BID*, участвующие в восстановлении повреждений двухцепочечной ДНК после воздействия ИИ, следует обратить внимание, поскольку они могут стать потенциальными маркерами радиационного воздействия.

Изменение степени метилирования генов-индикаторов, отмеченных в настоящем исследовании, с использованием наиболее простого скринингового метода анализа метилирования ДНК — метилчувствительной ПЦР совместно с цитогенетическим анализом может быть перспективным для оценки индивидуальной радиочувствительности и предрасположенности к развитию радиационно-индуцированных заболеваний у персонала, контактирующего в процессе профессиональной деятельности с ИИ.

Проведение дополнительного исследования на выборке с разными спектрами доз (от 0 до 1.5 Гр) позволит выявить дозозависимые изменения степени метилирования ДНК, что может быть положено в основу биологической дозиметрии нового поколения.

Авторы благодарны И.А. Милойчиковой и Н.Д. Тургуновой (медицинским физикам отделения лучевой терапии научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук) за помощь в облучении крови.

Исследование проводилось на базе Северского биофизического научного центра, Северск (забор крови у доноров, культивирование клеток, выделение ДНК), Научно-исследовательского института онкологии, Томск (облучение крови γ -терапевтическим аппаратом Theratron Equinox) и Медико-генетического научного центра им. академика Н.П. Бочкова, Москва (широкогеномное секвенирование методом XmaI-RRBS).

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2035 года”, Государственный контракт № 56.003.21.2 от 15.06.2021.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кужахметова Д.А.* Механизмы образования радиационно-индуцированных повреждений хромосом // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. 2020. Т. 1. № 2(29). С. 18–24.
2. *Бочков Н.П.* Хромосомы человека и облучение. М.: Атомиздат, 1971. 168 с.
3. *Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М. и др.* Молекулярные и клеточные последствия аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. 2011. Т. 51. № 1. С. 154–161.
4. *Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М. и др.* Хромосомные aberrации как показатель реакции лимфоцитов периферической крови человека на облучение *in vitro* при наличии в организме злокачественной опухоли // Радиационная биология. Радиоэкология. 2016. Т. 56. № 6. С. 565–569.
5. *Pajic J., Rakic B., Rovcanin B. et al.* Inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation: Comparison of the dicentric and micronucleus assays // Radiation and Environmental Biophysics. 2015. V. 54. P. 317–325.
6. *Pajic J., Rovcanin B., Kekic D. et al.* The influence of redox status on inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation // Intern. J. Rad. Biology. 2018. V. 94. № 6. P. 569–575. <https://doi.org/10.1007/s00411-015-0596-3>
7. *Druzhinin V.G., Sinitsky M.Yu., Larionov A.V. et al.* Assessing the level of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes in long-term resident children under conditions of high exposure to radon and its decay products // Mutagenesis. 2015. V. 30. № 5. P. 677–683. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev029>
8. *Qian Q.-Z., Cao X.-K., Shen F.-H., Wang Q.* Effects of ionising radiation on micronucleus formation and chromosomal aberrations in Chinese radiation workers // Rad. Protection Dosimetry. 2016. V. 168. № 2. P. 197–203. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncv290>
9. *Литвяков Н.В., Фрейдлин М.Б., Халюзова М.В. и др.* Частота и спектр цитогенетических нарушений у работников Сибирского химического комбината // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54. № 3. С. 283–296.
10. *Shi L., Fujioka K., Sakurai-Ozato N. et al.* Chromosomal abnormalities in human lymphocytes after computed tomography scan procedure // Radiat. Res. 2018. V. 190. № 4. P. 424–432. <https://doi.org/10.1667/RR14976.1>
11. *Franco R., Schoneveld O., Georgakilas A.G., Panayiotidis M.I.* Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis // Cancer Lett. 2008. V. 266. № 1. P. 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.026>
12. *Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.V.* Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure // Environmental Res. 2016. V. 146. P. 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
13. *Кузьмина Н.С., Лантеева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др.* Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся облучению в результате профессиональной деятельности // Соврем. проблемы радиационной генетики: Материалы Росс. конф. с международным участием, 27–28 июня. Дубна, 2019. С. 76–78.
14. *Kennedy E.M., Powell D.R., Li Z. et al.* Galactic cosmic radiation induces persistent epigenome alterations relevant to human lung cancer // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 6709. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24755-8>
15. *Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al.* Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers // Intern. J. Radiat. Biol. 2015. V. 91. № 2. P. 142–149. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
16. *Цымбал О.С., Исубакова Д.С., Брониовская Е.В. и др.* Роль метилирования *Vak1* в индукции хромосомных aberrаций при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении // Мед. радиология и радиационная безопасность. 2020. Т. 65. № 5. С. 29–34.
17. *Исубакова Д.С., Цымбал О.С., Брониовская Е.В. и др.* Метилирование промоторов генов апоптоза в лимфоцитах крови работников, подвергавшихся профессиональному внешнему облучению // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 2021. Т. 171. № 3. С. 339–343.
18. *Танас А.С., Кузнецова Е.Б., Борисова М.Э. и др.* Дизайн метода бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS) для анализа метилирования CpG-островков человека в больших выборках // Мол. биология. 2015. Т. 49. № 4. С. 689–699.
19. *Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al.* Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing // Epigenomics. 2017. V. 9. № 6. P. 833–847. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0031>
20. *Suomi T., Seyednasrollah F., Jaakkola M.K. et al.* ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing // PLoS Comput. Biol. 2017. V. 13. № 5. P. e1005562. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005562>

21. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2020. URL: <https://www.R-project.org/>
22. *Аклеев А.В., Шведов В.Л., Костюченко В.А.* Медико-биологические и экологические последствия радиоактивного загрязнения реки Теча. М.: Медбио-экстрем. 2001. 530 с.
23. *Чередниченко О.Г., Губицкая Е.Г.* Цитогенетический анализ медицинских работников контактирующих с источниками ионизирующей радиации // Научно-техн. журн. нац. ядерного центра Республики Казахстан. 2016. Т. 1. № 65. С. 112–117.
24. *Севаньяев А.В., Деденков А.Н.* Актуальные проблемы современной радиобиологии в свете оценки и прогнозирования последствий аварии на Чернобыльской АЭС // Радиобиология. 1990. Т. 30. № 5. С. 579–582.
25. *Jin H., Cho Y.* Structural and functional relationships of FAN1 // DNA Repair. 2017. V. 56. P. 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.016>
26. *Norton C., Clarke D., Holmstrom J. et al.* Altered epigenetic profiles in the placenta of preeclamptic and intra-uterine growth restriction patients // Cells. 2023. V. 12. № 8. P. 1130. <https://doi.org/10.3390/cells12081130>
27. *Dubash A.D., Guilluy Ch., Srougi M.C. et al.* The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals // PLoS One. 2011. V. 6. № 2. P. e17380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017380>
28. *Schaefer A., Der Ch.J.* RHOA takes the RHOad less traveled to cancer // Trends in Cancer. 2022. V. 8. № 8. P. 655–669. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.04.005>
29. *Zou L.-H., Shang Z.-F., Tan W. et al.* TNKS1BP1 functions in DNA double-strand break repair through facilitating DNA-PKcs autophosphorylation dependent on PARP-1 // Oncotarget. 2015. V. 6. № 9. P. 7011–7022. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3137>
30. *Katsuki Y., Jeggo P.A., Uchihara Y. et al.* DNA double-strand break end resection: A critical relay point for determining the pathway of repair and signaling // Genome Instability & Disease. 2020. V. 1. P. 155–171. <https://doi.org/10.1007/s42764-020-00017-8>

Assessing the Association of the Degree of DNA Methylation and the Frequency of Chromosomal Aberrations in Human Lymphocytes in a Single Irradiation of Blood *in vitro*

O. S. Tsymbal^{a,*}, D. S. Isubakova^a, E. V. Bronikovskaya^a, A. F. Nikolaeva^b, V. O. Sigin^b, A. I. Kalinkin^b, Zh. A. Startseva^c, N. V. Litviakov^{a, c}, I. V. Milto^{a, d}, and R. M. Takhauov^{a, d}

^a*Seversk Biophysical Research Center of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, 636013 Russia*

^b*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478 Russia*

^c*Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia*

^d*Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia*

*e-mail: olga-tsymbal@mail.ru

The most sensitive biomolecule under radiation exposure is DNA, whose damage manifests itself in the form of chromosomal aberrations (CA). The processes of DNA methylation, which are involved in the regulation of gene expression, replication, DNA repair, etc., are also affected by gamma radiation. The aim of the study was to evaluate the relationship between the degree of DNA methylation and the frequency of CA after acute *in vitro* irradiation of human blood lymphocytes with gamma radiation. The study involved 10 conditionally healthy workers of the Siberian Chemical Combine, in whose blood lymphocytes the degree of methylation of CpG-dinucleotides (wide-genome bisulfite sequencing, XmaI-Reduced representation bisulfite sequencing – XmaI-RRBS) and the frequency of CA (cytogenetic study) after acute *in vitro* blood irradiation with doses of 0 and 1.5 Gy were evaluated. After acute exposure to gamma radiation in lymphocytes, the frequency of aberrant cells, dicentric chromosomes, chromatid and chromosomal fragments increased. Correlation analysis of the status of CpG-dinucleotide methylation and the frequency of CA revealed changes in the degree of methylation of 97 genes, which strongly correlated positively (56 genes) or negatively (41 genes) with an increased frequency of CA. A primary genome-wide screening of genes whose methylation is correlates with a high frequency of CA was carried out. Many of the identified genes are promising as potential markers of radiation exposure and to study the mechanisms of formation of radiosensitivity of the body and radiore-sistance of tumors during radiation therapy.

Keywords: DNA methylation, chromosomal aberrations, acute irradiation, gamma radiation, blood lymphocytes, wide-genome bisulfite sequencing (XmaI-RRBS).