

КЛЕТОЧНЫЙ РЕПАРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ АТАКСИЕЙ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИЕЙ

© Е. А. Полуботко, А. Н. Шатрова, Н. М. Плескач, В. М. Михельсон, И. М. Спивак

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: janeana@mail.ru

Ключевым белком глобального клеточного ответа на повреждение ДНК является протеинкиназа АТМ. При мутациях в обоих аллелях гена, кодирующего АТМ, развивается тяжелое наследственное заболевание атаксия-телеангиэктазия (АТ) со сложным плейотропным фенотипом, характеризующееся многочисленными неврологическими нарушениями, высокой частотой развития опухолей, ускоренным старением и резко повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации. Это наиболее часто встречающийся синдром с наследственно повышенной радиочувствительностью. Накопленные к настоящему времени данные о роли белка АТМ в регуляции клеточного ответа на повреждение ДНК и подробное описание его белков-мишеней позволяют проанализировать как репаративный потенциал, так и признаки преждевременного старения как в клетках, полученных от больных АТ, так и в клетках гетерозиготных носителей данного заболевания. Первичные фибробласты, полученные от больных АТ и их родителей — гетерозиготных носителей мутантного гена *atm*, — были изучены с использованием методов проточной цитометрии и электрофореза отдельно взятых клеток (метод ДНК-комет). Было показано, что клетки больной АТ (АТ8SP) не формируют блоков клеточного цикла после ионизирующего облучения в течение всего эксперимента в отличие от клеток здорового донора, у которых блоки клеточного цикла в ответ на повреждающее воздействие формируются. Изменения параметров клеточного цикла после облучения клеток гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* наблюдаются, но менее ярко выражены, чем в клетках здорового донора. Способность к воссоединению разрывов ДНК после облучения также достоверно снижена в клетках больных АТ и гетерозиготных носителей заболевания по сравнению с клетками здорового донора. Клетки здорового донора способны воссоединить за 2.5 ч не менее 90 % повреждений ДНК, в клетках больных АТ восстанавливалось лишь около 30 % повреждений ДНК, а в клетках гетерозиготных носителей заболевания — приблизительно 50 %. Разница динамики процесса восстановления повреждений ДНК между разными семьями подтверждает данные о большом фенотипическом разнообразии проявлений данного заболевания.

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия, метод ДНК-комет, проточная цитометрия.

Клеточный ответ на повреждение ДНК является краеугольным камнем всей системы поддержания стабильности генома и в первую очередь включает в себя передачу информации о повреждении по множеству сигнальных путей (Sancar et al., 2004; Thaker, Zdzienicka, 2005). Ключевым белком клеточного ответа является протеинкиназа АТМ (*ataxia-telangiectasia mutant*). Она способна к автофосфорилированию и активированию своей протеинкиназной функции в ответ на возникновение конформационных изменений хроматина после появления двухнитевых разрывов ДНК и быстрому последующему фосфорилированию различных белков-мишеней (Shiloh, 2003; Lavin, 2008).

В результате мутации обоих аллелей гена *atm*, кодирующего белок АТМ, развивается атаксия-телеангиэктазия (АТ), или синдром Луи-Бар, — аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся мозжечковой атаксией, телеангиэктазиями, нарушением иммунитета, ускоренным старением и склонностью к злокачественным новообразованиям (Savitsky et al., 1995; Lavin, Shiloh, 1997; Sandoval et al., 1999; McKinnon et al., 2004; Lavin, 2008). Сам синдром является достаточно ред-

ким и проявляется в различных популяциях с частотой 1:40 000—1:200 000 (Arlett, Priestly, 1985; Спивак, 1999; Shiloh, 2003). В то же время его гетерозиготное носительство крайне высоко — от 4 до 7 % в различных популяциях. При этом нужно учитывать, что гетерозиготное носительство АТ приводит к повышенной радиочувствительности на клеточном уровне и как следствие — к развитию ранних опухолей, хотя и не имеет фенотипического выражения (Pulverer, 2003).

Репаративный потенциал клеток определяли методом ДНК-комет (Single-Cell Gel Electrophoresis — «DNA-comet assay»). Метод ДНК-комет является быстрым и чувствительным методом регистрации степени повреждения ДНК и позволяет изучать процессы репарации ДНК на уровне отдельных клеток. Данный метод применим в системах *in vivo* и *in vitro*. С его помощью обнаруживают двухнитевые разрывы, одонитевые разрывы, щелочеллабильные сайты ДНК, алкилированные основания (Collins et al., 2008; Shaposhnikov et al., 2008; Trzeciak et al., 2008; Collins, 2009). В настоящее время этот метод широко используется в исследованиях генотоксичности фармацевтических препаратов (Tice et al., 2000), репарации ДНК

(Collins, 2009), апоптоза (Omidkhoda et al., 2007), клинических исследованиях по пренатальной диагностике (Alarpetite, 1997), предрасположенности к онкологическим заболеваниям и терапии рака (Tronov et al., 2006). Самым распространенным объектом для популяционного анализа являются лимфоциты периферической крови и первичные фибробласты человека (Trzeciak et al., 2008). Особое преимущество этого метода — сравнительно небольшое количество клеток, необходимое для анализа: для получения препаратов их достаточно всего несколько тысяч.

Метод проточной цитометрии широко применяется в клеточной биологии для решения целого спектра научных проблем. Существуют два направления: проточная цитометрия и проточная цитометрия сортировки. Первое представляет собой самостоятельный, чисто аналитический подход, второе основывается на аналитических возможностях первого, но позволяет выделять интересные исследователя субпопуляции клеток и проводить с ними морфологические, биохимические и другие исследования (Muirhead et al., 1985; Полетаев, 1989; Shapiro, 1995). Быстрый технический прогресс в области проточной цитометрии позволяет с высокой чувствительностью количественно регистрировать различные структурные и функциональные характеристики индивидуальных клеток при минимальном их разрушении либо прижизненно. С помощью этого метода изучают параметры клеточного цикла и состояния хроматина в норме и при внешних воздействиях в различных клетках, в том числе опухолевых, разделяют различные клеточные типы по наличию специфических маркеров, измеряют длины теломер (Lauzon et al., 2000; Baerlocher et al., 2002; Капоор, Телфорд, 2004).

Способность формировать блоки клеточного цикла после повреждения является основным свойством нетрансформированной клетки и многими авторами связывается с активацией процессов репарации ДНК (Iiakis, 2003). В отличие от здоровых клеток клетки больных АТ отличаются радиорезистентностью и не формируют блоки клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК (Баренфельд и др., 1997; Varenfeld et al., 1998; Lavin, 2008).

Задача нашего исследования состояла в определении влияния радиационного влияния на параметры клеточного цикла и динамику репаративных процессов в клетках больных АТ и их кровных родственников — гетерозиготных носителей мутантного гена *atm*.

Материал и методика

Клеточные культуры. В работе были использованы штаммы диплоидных фибробластов, полученные от больных АТ, гетерозиготных носителей мутации в гене *atm* и здоровых доноров.

Получение первичной культуры фибробластов кожи. Донорами фибробластов стали два пациента с АТ и их родители, а также больная с атаксией, развившейся в результате опухоли мозжечка. Для выделения фибробластов полученные с соблюдением всех правил стерильности фрагменты кожи с области предплечья помещали в чашку Петри в питательную среду DMEM (Биолот, Россия, или Sigma, США) с добавлением антибиотиков и механически измельчали до получения как можно более дисперсных фрагментов. Затем кожные фрагменты помещали под покровное стекло в чашки Петри диаметром 3 см (Nunc, США) и добавляли полную ростовую питательную среду DMEM (Gibco, США) с 16 %

сыворотки эмбрионов коров (Hyclone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл фунгицида и 0.3 мг/мл L-глутамин. Эксплантат кожи инкубировали, меняя питательную среду 1 раз в 4—7 сут до появления достаточного количества фибробластов. При получении монослоя клетки снимали с подложки стандартным способом с помощью раствора трипсин-ЭДТА и культивировали в чашках Петри в среде F-10 или DMEM с добавлением 13 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) при 37 °С в атмосфере с содержанием 5 % CO₂.

Штаммы диплоидных фибробластов, полученные от членов первой семьи (АТ6) — девушки 16 лет с АТ и ее фенотипически здоровых матери (М) и отца (F), — были обозначены соответственно АТ6SP, АТ(М)6SP и АТ(F)6SP. Штаммы диплоидных фибробластов, полученные от членов второй семьи (АТ8) — девочки 11 лет с АТ, ее фенотипически здоровых матери (М) и отца (F), — были обозначены соответственно АТ8SP, АТ(М)8SP и АТ(F)8SP. Диплоидные фибробласты, полученные от больной с атаксией, возникшей в результате опухоли мозжечка, были обозначены АТ7SP. В качестве контроля были использованы диплоидные фибробласты крайней плоти мальчика 11 лет — VН10 (Nygren et al., 1994; Kolman et al., 1997), любезно предоставленные проф. Адой Кольман (А. Kolman, Стокгольмский университет, Швеция).

Для выяснения степени репаративного потенциала фибробласты облучали на рентгеновской установке РУМ-17 в дозе 2 Гр.

Метод ДНК-комет включает в себя следующие этапы: приготовление геля-слайда, лизис клеток, щелочная инкубация, электрофорез, нейтрализация, окраска слайдов, анализ и обработка данных. Все этапы (кроме последнего) проводили в условиях минимального попадания света, при 4 °С. Для получения геля-слайдов использовали предметные стекла, предварительно покрытые 1%-ным водным раствором агарозы (Биолот, Россия). Далее 50 мкл клеточной суспензии смешивали со 150 мкл агарозы с низкой точкой плавления (Agarose-prep. Ultra 100w-gelling and melting point LKB, Швеция) (1%-ный раствор в PBS), имеющей температуру 37 °С, и быстро наносили на подготовленное предметное стекло примерно по 100 мкл на каждый слайд, сверху накрывали покровным стеклом и оставляли на 5 мин при 4 °С. Затем снимали покровное стекло и приступали к этапу лизиса. Непосредственно перед процедурой лизиса к лизирующему буферу (2.5 mM NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10) добавляли детергент Тритон X-100 (Helicon, Россия) до конечной концентрации 1 %. Лизис проводили в течение 1 ч при 4 °С. После этапа лизиса и удаления избытка лизирующего буфера с помощью фильтровальной бумаги слайды подсушивали и подвергали дальнейшей процедуре щелочной обработки. Для щелочной инкубации и электрофореза использовали один и тот же буфер (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH 13) и, следовательно, первую процедуру проводили сразу в электрофорезном танке для избежания лишних манипуляций со слайдами, которые могли бы привести к потере геля с поверхности предметного стекла. Длительность щелочной инкубации составила 40 мин при 4 °С. Электрофорез проводили в течение 40 мин (4 °С, напряжение 5 В/см). После извлечения слайдов избыток электрофоретического буфера удаляли фильтровальной бумагой, затем слайды подсушива-

ли 5—7 мин перед этапом нейтрализации. Слайды нейтрализовали 3-кратной промывкой в 0.4 М Tris, pH 7.5, по 5 мин, после чего приступали к этапу окраски. Для окраски слайдов использовали SYBR® Green I (Sigma, США) в 90%-ном глицерине (Биолот, Россия) в разведении 1.5 мкл на 10 мл буфера TE (Tris-EDTA, pH 7.5) (Sigma, США). Затем после нанесения покровных стекол слайды помещали во влажную камеру и оставляли в холодно-дильнике при 4 °C до момента визуального анализа.

Микроскопия и анализ изображений. Визуализацию «комет» проводили на флуоресцентном микроскопе Zeiss LSM 5 PASCAL (источник света ртутная лампа 250 ватт, длина волны возбуждающего света задавалась фильтром 516—560 нм, барьерный фильтр 590 нм, увеличение 40×). Ввиду отсутствия специально адаптированной для метода компьютерной программы оценку «комет» проводили визуально. Для характеристики каждой линии проводили по три эксперимента, в ходе которых оценивали содержание клеток каждого типа — клетки без ДНК-повреждений, клетки с некоторыми ДНК-повреждениями, клетки со значительными ДНК-повреждениями. Далее для каждого конкретного случая высчитывали площадь «комет» (S) по формуле $S = N \cdot 0 + M1 \cdot 0.5 + N2 \cdot 1$, где N — количество клеток, относящихся к типу a , $M1$ — количество клеток, относящихся к типу b , $N2$ — количество клеток, относящихся к типу c (рис. 1).

Метод проточной цитометрии. В опыт брали все клетки с чашки Петри, ресуспендировали в PBS, добавляли РНКазу (0.25 мг/мл), PI (иодид пропидия; 50 мкг/мл) и сапонин (200 мкг/мл) или 0.1 % Тритон. Анализ производили на цитометре Odam (Brucker, Франция).

Обработку результатов проводили с помощью программы MS Excel 2007. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты

Оценка репаративной способности методом ДНК-комет. Площади «комет» были определены в клетках как без повреждающего воздействия, так и в различное время после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр. Суммарная площадь «комет» соответствует степени повреждения ДНК исследуемых клеток. Анализ результатов выявил существенные различия между клетками всех исследованных штаммов. Средние суммарные площади «комет» по результатам трех независимых опытов приведены в табл. 1. Видно, что интактные клетки штаммов, полученных от больных АТ (клетки АТ6SP и АТ8SP), содержат достоверно большее количество ДНК-повреждений. Особенно существенно это выражено в клетках АТ8SP. Через 30 мин после рентгеновского облучения суммарная площадь «комет» резко возрастала во всех изученных штаммах, что соответствовало появлению в ДНК клеток большого количества разрывов. При этом количество разрывов в клетках больных АТ незначительно (в среднем на 10 %), но достоверно превышало таковое как в клетках здорового донора, так и в штаммах, полученных от гетерозиготных носителей заболевания. Способность клеток к воссоединению разрывов ДНК после облучения определялась суммарными площадями «комет» через 2.5 ч после облучения. За этот период времени в клетках больных АТ происходила репарация лишь трети повреждений ДНК, в то время как в клетках здорового донора этот процесс практически завершался. В то же

Таблица 1

Средние значения площадей комет (S) до и после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр

Название штамма клеток	Площадь комет (S)		
	без облучения	30 мин после облучения	2.5 ч после облучения
VH10	3.00 ± 0.86	83.00 ± 3.90	13.83 ± 5.83
AT6SP	9.50 ± 5.00 ^a	94.50 ± 1.80 ^a	72.16 ± 2.56 ^b
AT(F)6SP	9.50 ± 2.18 ^a	81.16 ± 6.71	22.66 ± 2.56 ^a
AT(M)6SP	8.66 ± 4.31 ^a	78.16 ± 6.80	20.00 ± 0.86
AT8SP	18.83 ± 2.93 ^b	93.33 ± 0.17 ^a	74.16 ± 1.61 ^b
AT(M)8SP	6.66 ± 0.76	83.50 ± 1.00	38.16 ± 1.61 ^a
AT(F)8SP	4.50 ± 0.86	85.83 ± 2.84	28.83 ± 2.02 ^a
AT7SP	9.66 ± 1.23 ^a	85.50 ± 2.92	32.66 ± 3.13 ^a

^a Статистически достоверные отличия от контроля при $P < 0.05$.

^b Статистически достоверные отличия от контроля при $P < 0.001$.

время в клетках гетерозиготных носителей заболевания воссоединение разрывов ДНК проходило быстрее, чем у больных АТ, но не достигало уровня репарации ДНК в клетках здорового донора. Следует отметить, что фибробласты, полученные от больной с клинической формой атаксии, возникшей в результате опухоли мозжечка (клетки АТ7SP), демонстрируют также сниженный репаративный потенциал по сравнению с клетками здорового донора и по этому показателю сходны с клетками гетерозиготных носителей АТ.

Одновременно на тех же препаратах были подсчитаны апоптотные клетки, которые отличаются от обычных «комет» тем, что у них практически отсутствует «ядро кометы», а вся ДНК сосредоточена в «хвосте» (рис. 1, 2). Эти клетки мы не учитывали при подсчете суммарных площадей «комет», так как считали их нежизнеспособными. На рис. 2 представлена динамика доли таких клеток в различных исследованных штаммах в интактном состоянии и после рентгеновского облучения. В клетках штаммов больных АТ уровень спонтанного апоптоза существенно выше, чем в клетках здорового донора, и несколько выше, чем в клетках гетерозиготных носителей заболевания. Количество апоптотных клеток после облучения также существенно возрастает в клетках больных АТ (рис. 2, кривая 1), чем в клетках здорового донора (рис. 2, кривая 2), а в клетках гетерозиготных носителей заболевания мы наблюдаем промежуточный результат (рис. 2, кривые 3 и 4).

Анализ клеточного цикла методом проточной цитометрии. Ранее нами этим методом были изучены клетки штаммов, полученных от больной АТ6SP и ее кровных родственников (Спивак и др., 2007). В табл. 2 и на рис. 3 мы приводим результаты, полученные при исследовании параметров клеточного цикла как при обычном росте клеточных культур, так и после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр, для штаммов фибробластов больной АТ8SP и членов ее семьи, а также больной АТ7SP, страдающей атаксией, возникшей в результате опухоли мозжечка. Показано, что клетки здорового донора VH10 имеют ненарушенную систему блокирования клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, что приводит к накоплению этих клеток в фазах G_1 и G_2 в течение 3 сут после рентгеновского облучения. Клетки

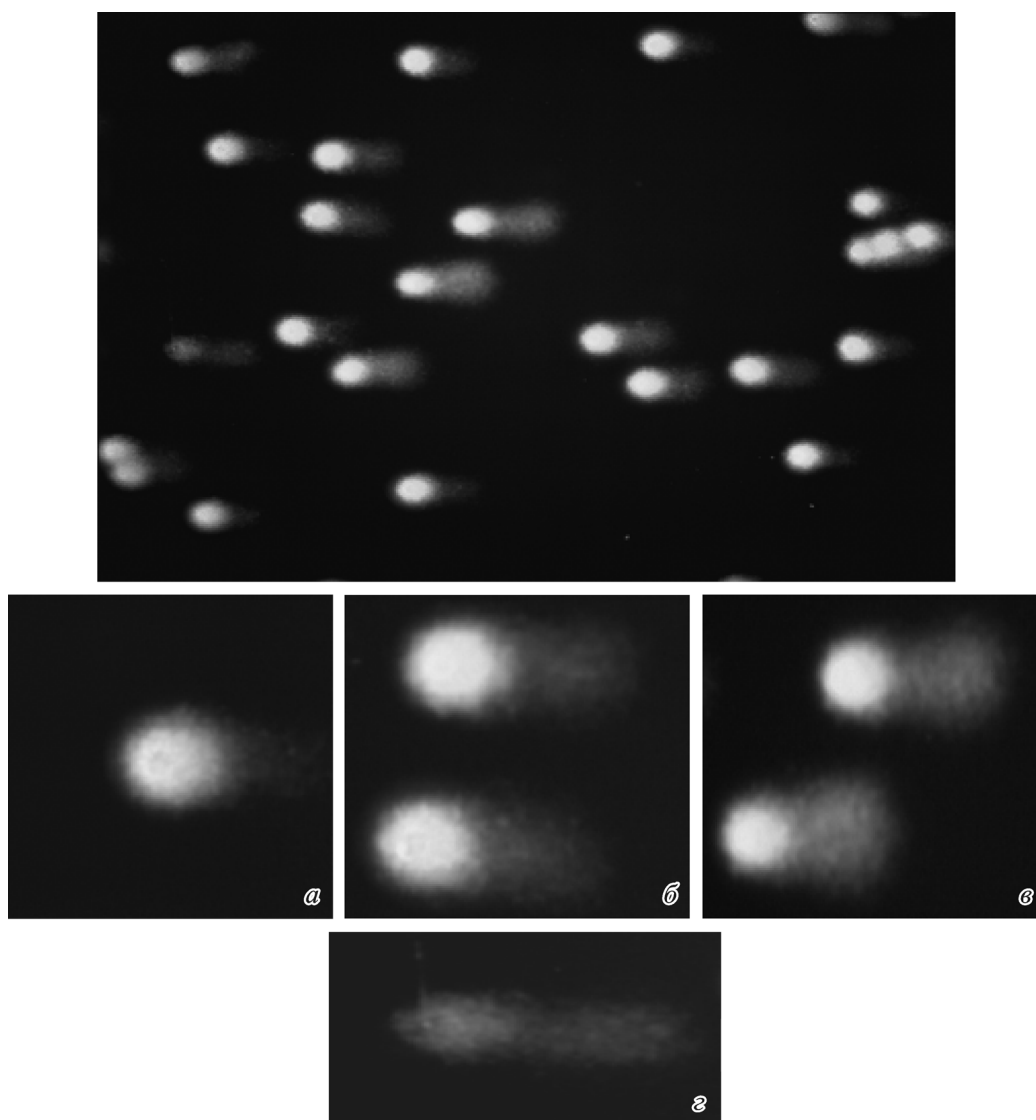


Рис. 1. Гель-электрофорез первичных фибробластов человека после γ -облучения в дозе 2 Гр (увеличение 40 \times , окраска SYBR Green I).

a — клетки без ДНК-повреждений, *б* — клетки с некоторыми ДНК-повреждениями, *в* — клетки со значительными ДНК-повреждениями, *г* — апоптотная клетка.

больной АТ (АТ8SP), напротив, демонстрируют полную радиорезистентность и не изменяют параметров клеточного цикла в течение всего эксперимента. Клетки гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* демонстрируют менее выраженные и протяженные блоки клеточного цикла, нежели клетки здорового донора. Сходная картина наблюдается и в клетках больной АТ7SP. При сравнении динамики роста клеток исследованных штаммов видно, что клетки здорового донора гораздо сильнее зависят от ростовых факторов среды и быстрее снижают уровень синтеза ДНК, чем клетки больных АТ и гетерозиготных носителей заболевания.

Обсуждение

Анализ количества повреждений ДНК, в первую очередь двухнитевых разрывов (DSBs), после действия генотоксических агентов является одним из наиболее распространенных подходов для изучения способности клеток к

репарации. Методом ДНК-комет было показано, что количество образующихся разрывов ДНК зависит от дозы и природы повреждающего агента, а способность различ-

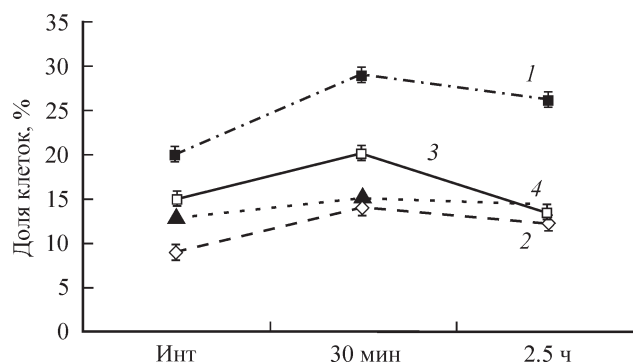


Рис. 2. Анализ изменения клеток в апоптозе до и после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр.

1 — АТ8SP, 2 — VH10, 3 — АТ8(F)SP, 4 — АТ8(M)SP.

Таблица 2

Распределение клеток по фазам клеточного цикла в течение 4 сут до и после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр

Название штамма клеток	Фаза клеточного цикла	Число клеток	Исходная культура, %	Без облучения, 1 сут роста, %	24 ч после облучения, %	2 сут роста, %	48 ч после облучения, %	3 сут роста, %	72 ч после облучения, %	4 сут роста, %
VH10	G ₀	100	95.66	47.11	73.56	82.83	81.24	90.72	82.31	90.99
	S		0.00	17.69	9.42	9.86	2.44	3.24	2.43	2.71
	G ₂ -M		4.34	35.20	17.02	7.31	16.32	6.04	15.26	6.30
AT8SP	G ₀	100	54.88	39.15	44.38	55.72	48.33	52.48	44.96	52.22
	S		14.36	26.01	27.74	12.82	21.97	15.02	24.03	30.00
	G ₂ -M		30.76	34.84	27.88	31.46	29.70	32.50	31.01	17.78
AT(M)8SP	G ₀	100	80.70	74.20	71.70	75.20	68.76	77.70	66.73	82.70
	S		4.70	7.40	4.80	15.40	4.60	8.80	7.58	4.84
	G ₂ -M		14.60	18.40	23.50	9.40	26.64	13.50	25.69	12.46
AT(F)8SP	G ₀	100	80.50	65.80	69.57	80.10	64.48	74.20	68.82	64.60
	S		5.10	16.70	6.50	12.65	11.74	14.50	10.75	8.21
	G ₂ -M		14.40	17.50	23.93	7.25	23.78	11.30	20.43	27.19
AT7SP	G ₀	100	85.70	75.70	70.40	70.40	68.35	64.50	68.90	71.30
	S		4.93	20.04	2.94	14.70	11.70	17.00	15.30	11.00
	G ₂ -M		9.37	4.26	26.66	14.90	19.95	18.50	15.80	17.70

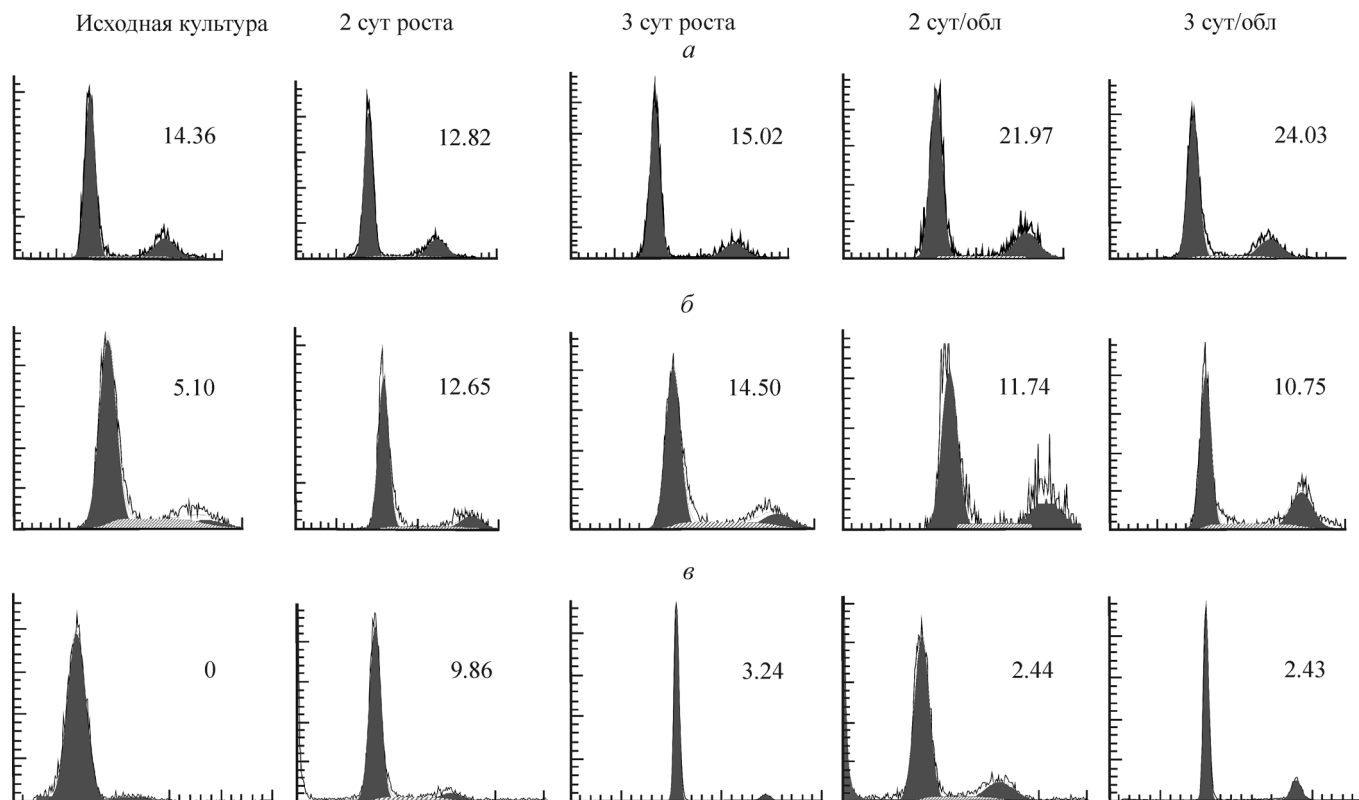


Рис. 3. Зависимость распределения штаммов AT8SP (а), AT8(F)8SP (б), VH10 (в) по фазам клеточного цикла до и после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр.

По горизонтали — содержание ДНК, ед. плоидности (с); по вертикали — число клеток. На каждой гистограмме указана доля клеток (%), находящихся в фазе S.

ных типов клеток воссоединять разрывы — от активности их систем репарации и от времени (Kolman et al., 1997; Chovanec et al., 1998).

Под действием ионизирующей радиации двухнитевые разрывы ДНК (DSBs) в диплоидных фибробластах, полученных от здорового донора, формируются в первые минуты после повреждения и репарируются на 90 % менее чем за 4 ч (Mirzayans et al., 2006), что соответствует данным, полученным нами для штамма нормальных фибробластов человека VNI0. Штаммы, полученные от больных АТ, демонстрируют существенную задержку репарации, воссоединение разрывов за 2.5 ч происходит лишь на 20—30 %. Это подтверждают данные о снижении активности процессов репарации в клетках больных АТ, полученные ранее в нашей лаборатории с использованием других методов (Хомасуридзе и др., 1999; Спивак и др., 2005; Смирнова и др., 2008). Динамика воссоединения разрывов после рентгеновского облучения, описанная нами с использованием метода ДНК-комет, соответствует той, что мы наблюдали, применяя метод непрямой иммунофлуоресценции для определения количества фокусов белков γ -H2AX и 53BP1 (Полуботко и др., 2009). Восстановление поврежденной ДНК, о котором мы можем судить по элиминации фокусов белков γ -H2AX и 53BP1 в ядрах клеток, у больных АТ за 24 ч происходит лишь наполовину, в то время как в клетках здорового донора репарация ДНК к этому времени завершается. В клетках гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* процессы репарации ДНК были замедлены, но не так отчетливо, как у больных АТ.

В литературе было описано, что количество спонтанных повреждений ДНК в клетках увеличивается с возрастом (Sirota, Kuznetsova, 2008). Также известно, что при обработке повреждающими агентами фибробласты более старых животных чаще уходят в апоптоз (Анисимов и др., 2008). Наши данные показывают, что уровень спонтанных нарушений ДНК и апоптоза в интактных клетках АТ превышает уровень таковых в контроле в 3 раза (клетки АТ6SP) и в 6 раз (клетки АТ8SP). В то же время интактные клетки гетерозиготных носителей мутантного гена также демонстрируют повышенный уровень спонтанных повреждений ДНК, но менее выраженный, чем у больных АТ. Ранее при исследовании клеток, полученных от больных АТ и их кровных родственников — гетерозиготных носителей заболевания, — нами было показано, что клеточные маркеры старения выявляются с более высокой частотой как в клетках самих больных АТ, так и в клетках гетерозиготных носителей заболевания, чем в клетках здорового донора (Полуботко и др., 2009). Сопоставляя полученные нами данные с данными литературы, можно отметить, что штаммы больных АТ демонстрируют признаки ускоренного старения и снижения активности репаративных процессов на клеточном уровне, а в клетках гетерозиготных носителей данного заболевания выявляется промежуточный фенотип. Все эти данные в совокупности подтверждают наше представление об АТ как о синдроме преждевременного старения.

Анализ параметров клеточного цикла методом проточной цитометрии позволяет выявить способность клеток к формированию блоков G₁/S и G₂/M после облучения (Iwabuchi et al., 2008). Данные литературы показывают, что клетки больных АТ демонстрируют радиорезистентность клеточного цикла (Houldsworth, Lavin, 1980; Beamish, Lavin, 1994; Beamish et al., 1996; Nannan et al., 2002) и описан сигнальный путь, необходимый

для ее проявления (Bai, Murnane, 2003). Полученные нами результаты об отсутствии блоков клеточного цикла подтверждают диагноз АТ у больных АТ6SP и АТ8SP и показывают влияние гетерозиготного носительства заболевания на способность формировать блоки клеточного цикла в ответ на облучение.

Крайне интересным представляется анализ клеток больной АТ7SP, у которой атаксия является результатом опухоли мозжечка. В то же время у этой больной по сравнению с клетками здорового донора понижена способность к репарации разрывов ДНК и выявляется повышенное количество маркеров старения, так же как у гетерозиготных носителей АТ. Способность к формированию блоков клеточного цикла в ответ на рентгеновское облучение у больной АТ7SP также снижена. При анализе этого клинического случая нужно учитывать, что уровень радиочувствительности клеток больных АТ столь широк, что позволил выделить особую группу больных, диагностированных как АТ-вариант (Gilad et al., 1998). У таких пациентов наблюдались явные признаки заболевания, но чувствительность клеток к ионизирующей радиации по ряду признаков была выражена слабее, чем при классической АТ (Taylor et al., 1987). Ранее в нашей лаборатории были описаны клетки, отнесенные нами к АТ-варианту (клетки АТ1SP и АТ2SP) (Спивак и др., 2005). К сожалению, подробный анализ этих клеток методом проточной цитометрии и ДНК-комет не проводился, как и анализ этих штаммов на маркеры старения. Совместный анализ всех этих данных позволяет предположить, что штамм АТ7SP может являться как гетерозиготным носителем АТ или АТ-варианта, так и гетерозиготным носителем дефекта какого-либо другого гена, вовлеченного в репарацию двухнитевых разрывов ДНК (например, ATR или ligIV). В любом случае у этой больной есть повышенная предрасположенность к развитию опухолей и преждевременному старению, что необходимо учитывать при терапии.

Список литературы

- Анисимов В. Н., Бакеева Л. Е., Егормин П. А., Филенко О. Ф., Исакова Е. Ф., Манских В. Н., Михельсон В. М., Пантелева А. А., Пасюкова Е. Г., Пискунова Т. С., Попович И. Г., Рощина Н. В., Рыбина О. Ю., Сапрунова В. Б., Самойлова Т. А., Семенченко А. В., Скулачев М. В., Спивак И. М., Цыбулько Е. А., Тындык М. Л., Высоких М. Ю., Юрова М. Н., Забегинский М. А., Скулачев В. П. 2008. SkQ1 увеличивает продолжительность жизни и предотвращает развитие признаков старения. Биохимия. 73 (12) : 1655—1670.
- Баренфельд Л. С., Нергадзе С. Г., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 1997. О механизме радиорезистентного синтеза ДНК при атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 39 (1) : 20—24.
- Полетаев А. И. 1989. Проточная цитометрия и сортировка в цитологии, молекулярной биологии, биотехнологии и медицине. Итоги науки и техники. Сер. «Общие проблемы физико-химической биологии». М.: ВИНТИ. 87 с.
- Полуботко Е. А., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Михельсон В. М., Спивак И. М. 2009. Особенности преждевременного старения при атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 51 (8) : 712—718.
- Смирнова Н. В., Спивак И. М., Плескач Н. М., Жеребцов С. В., Аксенов Н. Л., Михельсон В. М. 2008. Атипичный синдром Вернера: нарушения эпигенетической регуляции и ответа на повреждения РНК. Цитология. 50 (10) : 868—877.
- Спивак И. М. 1999. Наследственные болезни с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41 (5) : 338—380.
- Спивак И. М., Плескач Н. М., Смирнова Н. В., Шапурова А. Н., Михельсон В. М. 2007. Новые подходы к диагностике

повышенной радиочувствительности клеток человека. Технологии живых систем. 4 (5—6) : 39—54.

Спивак И. М., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Ледацева Т. А., Михельсон В. М. 2005. Особенности стабилизации белка p53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 47 (10) : 898—906.

Хомасуридзе М. М., Спивак И. М., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 1999. Особенности радиочувствительности клеток больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 41 (5) : 412—419.

Alapetite C., Benoit A., Moustacchi E., Sarasin A. 1997. The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of *Xeroderma pigmentosum* and trichothiodystrophy. J. Invest. Dermatol. 108 (2) : 154—159.

Arlett C. F., Priestley A. 1985. An assessment of the radiosensitivity of ataxia-telangiectasia heterozygotes. Kroc. Found. Ser. 19 : 101—109.

Baerlocher G. M., Mak J., Tien T., Lansdorp P. M. 2002. Telomere length measurement by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. Cytometry. 47 (2) : 89—99.

Bai Y., Murnane J. P. 2003. Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM. Mol. Cancer Res. 1 (14) : 1058—1069.

Barenfeld L. S., Nergadze S. G., Pleskach N. M., Prokofjeva V. V., Mikhelson V. M. 1998. Decreased number of simultaneously operating adjacent clusters of replicons in some human strains with and without x-irradiation. Mutat. Res. 408 (3) : 219—226.

Beamish H., Lavin M. F. 1994. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. Int. J. Radiat. Biol. 65 : 175—184.

Beamish H., Williams R., Chen P., Lavin M. 1996. Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. J. Biol. Chem. 271 : 20 486—20 493.

Chovanec M., Naslund M., Spivak I., Dusinska M., Cedervall B., Kolman A. 1998. Rejoining of DNA strand breaks induced by propylene oxide and epichlorohydrin in human diploid fibroblasts. Environ. Mol. Mut. 32 (3) : 223—228.

Collins A. R. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. Mutat. Res. 681 (1) : 24—32.

Collins A. R., Oszcoz A. A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., Stetina R. 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis. 23 (3) : 143—151.

Gilad S., Chessa L., Khosravi R., Russell P., Galanty Y., Piane M., Gatti R. A., Jorgensen T. J., Shiloh Y., Bar-Shira A. 1998. Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. Amer. J. Hum. Genet. 62 (3) : 551—561.

Hannan M. A., Hellani A., Al-Khodairy F. M., Kunhi M., Siddiqui Y., Al-Yussef N., Pangue-Cruz N., Siewertsen M., Al-Ahdal M. N., Aboussekhra A. 2002. Deficiency in the repair of UV-induced DNA damage in human skin fibroblasts compromised for the ATM gene. Carcinogenesis. 23 (10) : 1617—1624.

Houldsworth J., Lavin M. F. 1980. Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. Nucl. Acids Res. 8 : 3709—3720.

Iliakis G., Wang, Y., Guan J., Wang H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. Oncogene. 37 : 5834—5847.

Iwabuchi K., Hashimoto M., Matsui T., Kurosawa A., Adachi N., Date T. 2008. Cell sorting analysis of cell cycle-dependent X-ray sensitivity in end joining-deficient human cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 372 (4) : 662—667.

Kapoor V., Telford W. G. 2004. Telomere length measurement by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. Methods Mol. Biol. 263 : 385—398.

Kolman A., Spivak I., Naslund M., Dusinska M., Cedervall B. 1997. Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblasts. Environ. Mol. Mutagen. 30 (1) : 40—46.

Lauzon W., Sanchez Dardon J., Cameron D. W., Badley A. D. 2000. Flow cytometric measurement of telomere length. Cytometry. 42 (3) : 159—164.

Lavin M. F., Shiloh Y. 1997. The genetic defect in ataxiatelangiectasia. Annu. Rev. Immunol. 15 : 177—202.

Lavin M. F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (10) : 759—769.

McKinnon P. J. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. EMBO Rep. 5 : 772—776.

Mirzayans R., Severin D., Murray D. 2006. Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 66 (5) : 1498—1505.

Muirhead K. A., Kloszewski E. D., Antell L. A., Griswold D. E. 1985. Identification of live cells for flow cytometric analysis of lymphoid subset proliferation in low viability populations. J. Immunol. Methods. 77 (1) : 77—86.

Nygren J., Cedervall B., Ericksson M., Dusinska M., Kolman A. 1994. Induction of DNA strand breaks by ethylene oxide in human diploid fibroblasts. Environ. Mol. Mutagen. 24 (3) : 161—167.

Omidkhoda A., Mozdarani H., Movasaghpoor A., Fathollah A. A. 2007. Study of apoptosis in labeled mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide using neutral comet assay. Toxicol. In Vitro. 21 (6) : 1191—1196.

Pulverer B. 2003. ATM Machine. Nature Cell Biol. 5 : 96.

Sancar A., Lindsey-boltz L. A., Unsal-Kaçmaz K., Linn S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu. Rev. Biochem. 73 : 39—85.

Sandoval N., Platzter M., Rosenthal A., Doerk T., Bendix R., Skawran B., Stuhmann M., Wegner R.-D., Sperling K., Banin S., Shiloh Y., Baumer A., Bernthaler U., Sennefelder H., Brohm M., Weber B., Schindler D. 1999. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. Hum. Mol. Genet. 8 (1) : 69—79.

Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaita L., Tagle D., Smith S., Uziel T., Sfez S., Ashkenazi S., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S. A., Simmons A., Clines G. A., Sartiel A., Gatti R. A., Chessa L., Sanal O., Lavin M. F., Jaspers N. G., Taylor A. M., Arlett C. F., Miki T., Weissman S. M., Lovett M., Collins F. S., Shiloh Y. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science. 268 (5218) : 1749—1753.

Shapiro H. M. 1995. Practical flow cytometry. 3 : 412—425.

Shaposhnikov S. A., Salenko V. B., Brunborg G., Nygren J., Collins A. R. 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? Electrophoresis. 29 (14) : 3005—3012.

Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nature Reviews. 3 (3) : 155—168.

Sirota N. P., Kuznetsova E. A. 2008. Spontaneous DNA damage in peripheral blood leukocytes from donors of different age. Bull. Exp. Biol. Med. 145 (2) : 194—197.

Taylor A. M., Flude E., Laher B., Stacey M., McKay E., Watt J., Green S. H., Harding A. E. 1987. Variant forms of ataxia telangiectasia. J. Med. Genet. 24 (11) : 669—677.

Thaker J., Zdzienicka M. Z. 2005. The XRCC genes: explaining roles in DNA double-strand break repair. DNA Repair. 4 (2) : 303—314.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35 (3) : 206—221.

Tronov V. A., Kramarenko I. I., Kozlova A. D., Dederer L. J., Kedrova A. G., Gorbacheva L. B. 2006. Sensitivity of human lymphocytes to genotoxic effect of n-methyl-n-nitrosourea: possible relation to gynecological cancers. Exp. Oncol. 28 (4) : 314—318.

Trzeciak A. R., Barnes J., Ejiogu N., Foster K., Brant L. J., Zonderman A. B., Evans M. K. 2008. Age, sex, and race influence single-strand break repair capacity in a human population. Free Radic. Biol. Med. 45 (12) : 141—163.

CELLULAR REPAIR POTENTIAL IN FAMILIES OF ATAXIA-TELANGIECTASIA PATIENTS

*E. A. Polubotko, A. N. Shatrova, N. M. Pleskach, V. M. Mikhelson, I. M. Spivak*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: janeana@mail.ru

The key protein of the global cellular response to DNA damage is protein kinase ATM. Ataxia-telangiectasia (AT), a genetic disorder due to mutations in both alleles of ATM gene, is characterized by numerous neurological abnormalities, increased frequency of malignant tumors, premature ageing and increased radio sensitivity. AT is the most frequently found disease displaying inherited radio sensitivity. The data accumulated by this time on the role of the protein ATM in regulation of cellular response to DNA damage and detailed description of its proteins-targets allows to analyze repair potential and manifestation of premature ageing markers both in the cells obtained from AT patients and in the cells of their heterozygous parents. Primary skin fibroblasts obtained from AT patients and their heterozygous parents were analyzed by the flow cytometry and comet assay. It has been shown that cells of the patient AT8SP do not initiate cell cycle blockade after ionizing irradiation during all the experiment, unlike the healthy donor cells where cell cycle blockade is observed. Irradiated cells of the heterozygous parents demonstrated less brightly expressed changes in cell cycle parameters than healthy donor's cells did. The ability to repair DNA double-strand breaks (DSBs) after irradiation is reduced in the cells of AT patients and their heterozygous parents in comparison with the healthy donor's cells. Cells of the healthy donor were capable to repair not less than 90 % of DNA damage for 2.5 h. The repair efficiency in the cells of AT patients came only to about 30 % of DNA damage and in the cells of heterozygous carriers of the disease was approximately 50 %. The difference in the dynamics of DNA damage repair process in different proband's families is in accordance with the reports about great phenotypic variety of the given disease.
