

# Молекулярный ответ фибробластов кожи человека с мутацией m.14441 T>C на воздействие ионизирующего излучения в малых и средних дозах

Абрамова М.С.<sup>1</sup>, Конькова М.С.<sup>1</sup>, Момот В.Ю.<sup>2</sup>, Кальянов А.А.<sup>1</sup>

1 — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова»  
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

2 — ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)  
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

В качестве модели для исследования были выбраны фибробласты с мутацией m.14441 T>C в гене *ND6* и фибробласты здорового донора. Было показано, что данная мутация в гене *ND6* митохондриальной ДНК (мтДНК) оказывает значительное влияние на ответ клеток во время окислительного стресса.

**Ключевые слова:** митохондриальная ДНК, малые дозы радиации, средние дозы радиации, окислительный стресс

**Для цитирования:** Абрамова М.С., Конькова М.С., Момот В.Ю., Кальянов А.А. Молекулярный ответ фибробластов кожи человека с мутацией m.14441 T>C на воздействие ионизирующего излучения в малых и средних дозах. *Медицинская генетика* 2020; 19(9): 91-93.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.09.91-93

**Автор для корреспонденции:** Абрамова Маргарита Сергеевна; e-mail: rimargarii@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 18-34-00878, и в рамках государственного задания Минобрнауки России.

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

**Поступила:** 20.05.2020

## Molecular response of human skin fibroblasts with a mutation m.14441 T>C on the action of ionizing radiation in low and medium doses

Abramova M.S.<sup>1</sup>, Konkova M.S.<sup>1</sup>, Momot V.U.<sup>2</sup>, Kalyanov A.A.<sup>1</sup>

1 — Research Centre for Medical Genetics  
Moskvorechie st.1, Moscow, 115522, Russia

2 — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)  
Trubetskaya st. 8. Moscow, 119991, Russia

Fibroblasts with the mutation of m.14441 T>C in the *ND6* gene and fibroblasts of a healthy donor were chosen as a research model. It was shown that this mutation in the *ND6* mitochondrial DNA gene has a significant effect on the cellular response during oxidative stress.

**Key words:** mitochondrial DNA, low radiation doses, medium radiation doses, oxidative stress

**For citation:** Abramova M.S., Konkova M.S., Momot V.U., Kalyanov A.A. Molecular response of human skin fibroblasts with a mutation m. 14441 T>C on the action of ionizing radiation in low and medium doses. *Medical genetics*. 2020; 19(9): 91-93. (In Rus).

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2020.09.91-93

**Corresponding author:** Abramova Margarita Sergeevna; e-mail: rimargarii@gmail.com

**Funding.** The work was performed as part of the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation with the support of the Russian Foundation for Basic Research (project No. 183400878).

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Accepted:** 20.05.2020

Митохондрии играют важную роль в развитии клеточного ответа на действие радиации, и нарушение их функционирования может приводить к аномальному ответу на облучение. Ионизирующее излучение изменяет митохондриальные функции, усиливает митохондриальный окислительный стресс и индуцирует апоптоз [1]. Радиация вызы-

вает специфические изменения экспрессии митохондриальных генов, связанных с выживаемостью клеток, помимо этого, митохондрии были зарегистрированы как первичная мишень радиационно-индуцированного апоптоза [2]. Ген *ND6* мтДНК кодирует шестую субъединицу I комплекса дыхательной цепи митохондрий. Мутация m.14441 T>C приводит к замене в по-

липептидной цепи НАДН-дегидрогеназы-6 аминокислотного остатка тирозина на цистеин в положении 78, что приводит к развитию синдрома Ли. NADH- дегидрогеназа-6 принимает участие в окислительном фосфорилировании, которое нарушается при данной мутации.

**Цель исследования** — анализ роли митохондрий в регуляции процесса апоптоза при действии ионизирующего излучения (ИИ) в малых и средних дозах. В рамках сформулированной цели были поставлены следующие задачи: исследовать молекулярные механизмы действия ИИ в малых (3, 10 сГр) и средних (50 сГр, 1 Гр) дозах на культуры фибробластов здорового донора и больного с нарушением функционирования митохондрий и оценить воздействие радиации на уровень активных форм кислорода (АФК) в клетках, апоптоз, степень повреждения ядерной ДНК фибробластов.

### Материалы и методы

Клеточный материал для получения аутогенных фибробластов брали путем биопсии кожи в области предплечья (объемом 1-2 мм<sup>3</sup>) у здорового донора и пациента с Ли-подобным синдромом (m.14441 T>C в районе *ND6*). От всех доноров биологического материала было получено информированное согласие, работа была одобрена этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ».

Выделение клеток проводили в стерильных условиях путем ферментативной диссоциации 0,04% коллагеназой («Sigma», США) в среде ДМЕМ с глутамином, обогащенной глюкозой (4,5 г/л), в присутствии 20% эмбриональной телячьей сыворотки («Biosera», США). Плотность посева 10 тыс./лунку, культивирование при 37°C. Субконфлюентную культуру первичных фибробластов кожи здорового донора и пациента с Ли-подобным синдромом облучали при 20°C на установке импульсного рентгеновского излучения «АРИНА-07» «Спектрофлеш», Россия). Амплитуда напряжения на рентгеновской трубке составляла ~160кВ, максимум энергии в спектре излучения ~60кэВ, мощность дозы 0,10 Гр/мин. Исследуемые дозы ИИ — 3сГр, 10 сГр, 50сГр и 1 Гр. После облучения клетки инкубировали при 37°C. В качестве контроля использовали необлученные клетки. Гибель клеток в результате апоптоза оценивали с помощью маркеров апоптоза. Аннексин 5 — маркер раннего апоптоза. Количество фибробластов с признаками апоптоза после воздействия радиации оценивали счетчиком клеток Countess II FL AutomatedCellCounter («Termofisher»), а также при помощи проточной цитометрии (PartecCyFlowR ML, Германия) при окраске клеток пропидий йодидом и аннексином 5 — FITC.

Митохондрии являются одним из источников АФК в клетках. Увеличение синтеза АФК приводит к развитию окислительного стресса и патологии. Для анализа изменения внутриклеточного уровня АФК в фибробластах, использовали реагент - H2DCFH-DA (2,7-dichlorofluoresceindiacetate). Детекцию АФК осуществляли методом проточной цитометрии (PartecCyFlowR ML, Германия), позволяющим определить среднее количество АФК в клетке. Интенсивный синтез АФК может вызывать окисление и повреждение ядерной ДНК фибробластов. Исследование окисления ДНК проводили на фиксированных клетках, используя антитела к 8-оксидезоксигуанозину (8-oxodG), меченные флуорохромом. Детекция происходила при помощи двух методов — флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «CarlZeissMicroscopy», Германия) и проточной цитометрии (PartecCyFlowR ML, Германия).

### Результаты

В культуре клеток без мутации при действии средних доз радиации (50 сГр и 1 Гр) отмечался повышенный уровень апоптоза через 24 часа — на 15 и 25% соответственно возрастал уровень апоптотических клеток. Однако в культуре клеток с мутацией при действии радиации 50 сГр и 1Гр уровень апоптотических клеток через 24 часа не отличался от контрольного. Аналогичный результат был показан и при применении счетчика клеток Countess II FL AutomatedCellCounter («Termofisher») при окраске клеток пропидий йодидом и аннексином 5—FITC. Количество апоптотических клеток в популяции фибробластов без мутации возрастало на 20-30% через 24 часа после действия радиации в дозе 1 Гр, в культуре клеток с мутацией — снижалось на 5-7 % через 24 часа после действия радиации в дозе 1 Гр.

Мы проанализировали уровень АФК в фибробластах с мутацией и без через 40 мин—1 час после воздействия радиации. Показали, что в культуре клеток с мутацией уровень АФК снижается, тогда как в культуре клеток без мутации уровень АФК возрастает по мере увеличения дозы радиации. В результате исследования было показано, что в культуре фибробластов с мутацией не происходит возрастания уровня 8-oxodG, аналогично низкому уровню АФК, из-за неправильного функционирования митохондрий. В контрольных фибробластах происходит подъем 8-oxodG в раннее время (30 минут) при воздействии радиации в дозе 10 сГр. При воздействии дозы 50 сГр окислительные модификации сохраняются до 24 часов.

На основании полученных данных сделано предположение, что снижение апоптоза в культуре клеток с мутацией связано с изменением активации про- и антиапоптотических генов. Снижение уровня АФК в фибробластах больного синдромом Ли объясняется тем,

что митохондрии функционируют неправильно, в связи с чем синтеза АФК и возрастания уровня 8-oxodG не происходит. В результате воздействия радиации в дозе 3 сГр и 10 сГр происходит развитие адаптивного ответа (как было ранее показано на других типах нормально функционирующих клеток).

### Благодарности

За определение местоположения мутации m.14441 T>C в гене *ND6* в культуре фибробластов с митохон-

дриальной дисфункцией мы благодарны сотрудникам лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ МГНЦ.

### Литература/ References

1. Aypar U. et al. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? *Int. J. Radiat. Biol.* 2011; 87: 179-191
2. Shimura T, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1. *Cell Cycle*. 2016;15(11):1410-1414. doi:10.1080/15384101.2016.1170271