

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ԳԱԼԻՆԱ ԳԵՈՐԳԻԻ

ԴՆԹ-Ի ԵՎ ՔՐՈՄՈՍՈՄՆԵՐԻ ՎՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ՏԵՂԱՅՆԱՅՈՒՄԸ  
ՄԱՐԴՈՒ ԲՋԻՋՆԵՐՈՒՄ

Գ.00.15-«Գենետիկա» մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2012

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ОГАНЕСЯН ГАЛИНА ГЕОРГИЕВНА

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК И ХРОМОСОМ  
В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук  
по специальности 03.00.15 – «Генетика»

ЕРЕВАН – 2012

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական խորհրդատու՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ,  
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր  
Ռ.Մ. Հարությունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր  
Թ.Ֆ. Սարգսյան  
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Տ.Պ. Շկուրաստ  
բժշկ. գիտ. դոկտոր Գ.Գ. Ամարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Ռուսաստանի բժշկական գիտությունների  
ակադեմիայի Վ.Վ. Չալոսովի անվ.  
դեղագիտության գիտահետազոտական  
ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2012 թ. դեկտեմբերի 4-ին, ժամը 14<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՆ-ի 051 «Կենսաֆիզիկա» մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0025, ք. Երևան, Ա. Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2012 թ. նոյեմբերի 2-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր

Լ.Հ. Նավասարդյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный консультант:

член-корр. НАН РА, доктор биол. наук,  
профессор Р. М. Арутюнян

Официальные оппоненты:

доктор биол. наук, профессор Т.Ф. Саркисян  
доктор биол. наук, профессор Т.П. Шкурат  
доктор мед. наук Г.Г. Амарян

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт  
фармакологии им. В.В. Закусова  
Российской академии медицинских наук

Защита диссертации состоится 4-го декабря 2011 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании Специализированного совета 051 «Биофизика» ВАК РА при Ереванском государственном университете (РА, 0025, г. Ереван, ул. А. Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат разослан 2-го ноября 2012 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
доктор биол. наук, профессор

Л.А. Навасардян

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Индуцированные мутагенами повреждения наследственных структур распределяются по геному неравномерно. При воздействии химических мутагенов [Reeves and Margoles, 1974, Funes-Cravioto et al., 1974; Morad and Zawahri, 1977; Meyne et al., 1979; Savage and Reddy, 1987] и радиации [Knehr et al., 1996; Barquintero et al., 1998; Luomahaara et al., 1999; Braselmann et al., 2003; Anderson et al., 2006] неслучайное расположение точек разрывов на хромосомах является результатом сложных взаимоотношений между первичными повреждениями в хромосомной ДНК, структурой и позицией хромосом в ядре при экспозиции мутагеном, а также зависит от активности систем репарации в разных локусах генома [Obe et al., 2002]. В качестве факторов, обуславливающих характер распределения повреждений в геноме, рассматривают также уровень конденсации хроматина и плотность генов на хромосомах [Anderson et al., 2006; Radulescu et al., 2004; Puerto et al., 1999; Rapp et al., 2000]. Разнообразие возможных механизмов повреждения и репарации наследственных структур существенно осложняет интерпретацию природы различной чувствительности конкретных локусов генома к мутагенам [Obe et al., 2002].

Прогресс в изучении распределения повреждений в геноме обусловлен постоянной разработкой новых подходов для их идентификации. Особое место в их ряду занимает метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), позволяющий визуализировать конкретные последовательности ДНК как непосредственно на хромосомах, так и в интерфазных ядрах [Natarajan, 2001]. Комбинированные молекулярно-генетические технологии, основанные на сочетании методов ДНК-комет и микроядерного (МЯ) теста с техникой FISH, создают возможность на одних и тех же препаратах одновременно выявлять и локализовывать повреждения [Rapp et al., 2005; Norppa and Falck, 2003]. Комплексные методы значительно расширяют возможности прогноза и объективной оценки последствий повреждений генома, а также позволяют разработать новые биомаркеры мутагенных эффектов. Одним из результатов успешного применения FISH на препаратах комет является идентификация индуцированных мутагенами повреждений в специфических участках хромосом, имеющих важное значение для инициации лейкемогенеза [Escobar et al., 2007]. В целом, потребность в разработке и внедрении комбинированных подходов связана с ограниченными возможностями существующих стандартных систем оценки генетической опасности факторов окружающей среды и необходимостью их дальнейшей стандартизации и усовершенствования.

Поиск локусов повреждений на ДНК используется при исследовании наследственной природы заболеваний человека. В генетической токсикологии этот подход менее распространен в связи с его трудоемкостью и дороговизной и применяется лишь при особой целесообразности, определяемой большим масштабом и высоким риском применения тех или иных химических соединений. Приоритетными считаются исследования генотоксичности *лекарственных препаратов* и *компонентов пищевых продуктов* в связи с их широкой распространенностью, длительностью и регулярностью применения. Оценка

генотоксичности является обязательным элементом скрининга потенциальных лекарств, а их мутагенность может стать причиной для остановки разработки данных препаратов [Witte et al., 2007]. Данные по оценке генотоксичности пищевых компонентов заложены в основу разработки диетических норм, учитывающих оптимальный баланс мутагенных и антимутагенных факторов [Fenech, 2002]. Локализация повреждений ДНК в геноме нормальных клеток позволяет прогнозировать возможные последствия употребления определенных пищевых продуктов и побочные эффекты применения лекарств, а в геноме трансформированных клеток - оценить эффективность действия лекарственных препаратов.

Индукцированные мутагенами повреждения ДНК распределены неравномерно не только в геноме, но и по клеткам. Метод ДНК-комет позволяет оценить гетерогенность повреждений ДНК на уровне отдельных клеток при действии как ионизирующей радиации, так и цитостатиков [Olive and Durand, 2005].

Сравнение эффектов действия генотоксикантов на различные уровни структурной организации наследственного материала ("голая" ДНК; нуклеоид, представляющий собой свободную от мембран и гистонов суперспирализованную ядерную ДНК; ДНК интактных клеток) позволяет выделить мутагены, вступающие в непосредственное взаимодействие с ДНК, а также оценить роль клеточных компонентов, ферментов репарации и клеточного цикла в процессах мутагенеза. Клеточная [Singh et al., 1988] и неклеточная [Kasamatsu et al., 1996] модификации метода ДНК-комет позволяют исследовать повреждения ДНК в интактных клетках в целом и в самом нуклеоиде. Таким образом, совместное применение этих методик создает возможность дискриминировать прямые и непрямые мутагены.

Литературные сведения об избирательном действии химических мутагенов на определенные локусы ДНК немногочисленны, не систематизированы и нередко сводятся к простой констатации фактов. Исследование локализации повреждений ДНК и хромосом, которое является главной задачей настоящей работы, позволит расширить наше понимание механизмов мутагенеза вообще и путей воздействия конкретных мутагенных соединений, в частности, а также будет способствовать разработке новых биомаркеров мутагенного действия.

### **Цель исследования.**

Целью настоящего исследования явилось определение локализации повреждений ДНК и хромосом в лейкоцитах периферической крови человека и клеточных линиях различного тканевого происхождения на основе изучения генотоксических и генопротекторных свойств ряда биологически активных соединений.

**Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:**

1. Разработать и применить систему оценки генотоксических и генопротекторных свойств пищевых компонентов на основе микроядерного (МЯ) теста с блокированием цитокинеза.

2. Выявить локализацию индуцированных митомицином С повреждений генома при сочетании МЯ теста и FISH; оценить распределение повреждений по хромосомам в зависимости от их длины, позиции в ядре, а также плотности генов.
3. Определить генотоксичность широко применяемых (митомицин С, блеомицин, цисплатин) и новых потенциальных (порфирины CoTOEPyP(4), TOButPyP(4) и FeTOButPyP(4)) противоопухолевых соединений в стандартной и модифицированной (клеточной и неклеточной) версиях метода ДНК-комет в нормальных и опухолевых клетках.
4. Охарактеризовать распределение по клеткам повреждений ДНК в клеточной и неклеточной моделях при действии порфиринов в зависимости от их структуры и концентрации.
5. Разработать новый подход на основе комплекса методов ДНК-комет и FISH с теломерными (TTAGGG)<sub>n</sub> PNA (протеин-нуклеиновая кислота) пробамии, для определения локализации повреждений ДНК и теломер, индуцированных биологически активными соединениями.
6. Внедрить разработанную комплексную тест-систему для оценки локализации геномных повреждений, индуцированных противоопухолевыми соединениями.

#### **Научная новизна работы.**

1. Локализованы мишени действия широко применяемого противоопухолевого препарата митомицина С (ММС) на хромосомы человека на основе сочетания МЯ теста с техникой FISH. Показано, что ММС преимущественно повреждает хромосомы 9, 16 и X-хромосому у женщин. Фрагильность крупных гетерохроматиновых блоков хромосом 9 и 16 и инактивной (гетерохроматизированной) X-хромосомы у женщин позволяет рассматривать структуру хроматина в качестве основного фактора, определяющего повреждение и включение хромосом в ММС-индуцированные микроядра.
2. Впервые предложена и проверена гипотеза о возможной зависимости включения хромосом в микроядра от их позиции в интерфазном ядре. На девяти различных хромосомах человека показано, что вероятность их включения в ММС-индуцированные микроядра не зависит от их локализации в интерфазном ядре. Не обнаружена также зависимость включения хромосом в микроядра от их размера и плотности генов.
3. Впервые протекторный эффект бутирата (продукт ферментативной переработки пищевых волокон кишечной микрофлорой) по отношению к повреждениям хромосом, индуцированным модельными пищевыми мутагенами в клеточной линии аденомы кишечника человека, выявлен с применением МЯ теста с блокированием цитокинеза.
4. Впервые разработан подход, основанный на сочетании метода ДНК-комет с техникой FISH, для локализации действия противоопухолевых препаратов и их комбинаций в теломерах клеток млекопитающих.

5. Локализованы мишени действия широко применяемых противоопухолевых препаратов ММС, блеомицина (БЛМ) и цисплатина (*цис*-ДДП) на ДНК клеток человека с использованием сочетания методов ДНК-комет и FISH. Впервые чувствительность теломерных участков и всей ДНК к действию цитостатиков оценена с использованием специфичных для теломерных последовательностей  $(TTAGGG)_n$  PNA проб на препаратах комет в нормальных и трансформированных клетках. Выявлен равномерный характер распределения повреждений в геноме и теломерах нормальных лейкоцитов человека при действии БЛМ и ММС. Обнаружено, что при действии *цис*-ДДП на лейкоциты человека теломеры повреждаются чаще, чем вся ДНК. Также показано, что в трансформированных клетках повреждения ДНК распределены по геному неравномерно: теломеры клеток линии HT1080 менее чувствительны, а теломеры клеток линий CCRF-CEM и CHO - более чувствительны к действию БЛМ, чем вся ДНК.
6. Выявлена способность новых потенциальных противоопухолевых соединений (порфиринов CoTOEPyP(4), TOButPyP(4) и FeTOButPyP(4)) индуцировать повреждения ДНК как в клеточной, так и неклеточной моделях, что свидетельствует о возможности непосредственного взаимодействия порфиринов с ДНК.
7. Показана зависимость распределения индуцированных повреждений ДНК по клеткам от структуры порфиринов и их концентрации как в клеточной, так и неклеточной моделях.

**Практическая значимость работы.** На основании результатов проведенного исследования обоснована целесообразность локализации мишеней мутагенного действия в геноме с применением комбинаций методов ДНК-комет и МЯ с FISH при тестировании генотоксикантов. Указанный подход может рассматриваться как чувствительная тест-система регистрации мутагенных воздействий и как дополнительный метод генетико-токсикологических исследований.

Полученные результаты показывают, что применение флуоресцентных проб на препаратах микроядер позволяет определить их хромосомный состав и дифференцировать анеугенные и кластогенные эффекты.

Результаты совместного анализа повреждений ДНК и теломер при действии цитостатиков на *опухолевые клетки* подтверждают информативность данного подхода для оценки чувствительности трансформированных клеток разного происхождения к лекарственным препаратам, что в итоге способствует правильному подбору терапевтических средств. Анализ повреждений ДНК и теломер в *нормальных клетках* позволяет оценить побочные генетические эффекты действия цитостатиков. Таким образом, комплексное исследование повреждений ДНК и теломер на препаратах комет следует рассматривать в качестве самостоятельной тест-системы для анализа мутагенного действия цитостатиков.

Сочетание метода ДНК-комет с теломерными пробами также может применяться для разработки и скрининга потенциальных противоопухолевых соединений, которые избирательно дестабилизируют теломерные повторы.

Результаты оценки мутагенной активности соединений железа и перекиси водорода, а также протекторной активности бутирата в МЯ тесте расширяет базу данных по мутагенной и протекторной активности пищевых компонентов. Протекторная активность бутирата в МЯ тесте подтверждает роль диеты, обогащенной необходимым количеством пищевых волокон, для профилактики заболеваний кишечника.

Результаты работы свидетельствуют об информативности одновременного применения клеточной и неклеточной модификаций метода ДНК-комет для оценки роли клеточных компонентов в реализации генетических эффектов новых соединений.

Распределение индуцированных мутагенами повреждений по клеткам свидетельствует о неоднородности генотоксического ответа, обусловленной структурой и концентрацией генотоксикантов. В целом, полученные результаты позволяют рассматривать распределение повреждений по клеткам в качестве дополнительного биомаркера для идентификации субпопуляций клеток, чувствительных или устойчивых к действию лекарственных препаратов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Идентификация локусов повреждений ДНК и хромосом непосредственно на препаратах комет и микроядер, оценка распределения повреждений по геному и клеткам значительно расширяют возможности методов, входящих в стандартную батарею тестов на генотоксичность. Локализация мишеней действия мутагенов в геноме позволяет уточнить возможные генетические последствия повреждений наследственных структур и, таким образом, является актуальным подходом для оценки генотоксичности лекарственных препаратов и пищевых компонентов.
2. Результаты локализации действия мутагенов в геноме с применением комбинаций различных методов свидетельствуют о том, что характер распределения повреждений по геному и по клеткам зависит как от вида мутагена, так и от типа клеток. Показан *равномерный* характер распределения БЛМ- и ММС-индуцированных повреждений ДНК и теломер в лейкоцитах человека. Выявлен *неравномерный* характер распределения ММС-индуцированных повреждений девяти различных хромосом человека (3, 4, 6, 7, 9, 16, 17, 18 и X) и *цис-ДДП*-индуцированных повреждений ДНК и теломер в лейкоцитах человека, а также БЛМ-индуцированных повреждений ДНК и теломер в клетках линий НТ1080, ССRF-СЕМ и СНО.
3. Анализ повреждений ДНК в клеточной и неклеточной моделях показал возможность непосредственного взаимодействия новых порфиринов с ДНК и позволил оценить роль клеточных компонентов в реализации генотоксических эффектов этих соединений.
4. Характер распределения по клеткам повреждений, индуцированных порфиринами, зависит от их структуры и концентрации, что позволяет различать генотоксические эффекты на уровне чувствительности клеточных субпопуляций.

**Апробация работы.** Основные результаты работы доложены и обсуждены на следующих научных конференциях:

- HUPO 2nd Annual and IUBMB XIX World Congress Molecular and Cellular Proteomics. (Montreal, 2003),
- 21 GUM meeting (Wurzburg, 2004),
- 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine (Hersonissos, Crete, Greece, 2004),
- International Symposium on Hydration and Thermodynamics of Molecular Recognition (Tsakhkadzor, Armenia, 2005),
- Meeting of Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (2005),
- The Second International Conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”, dedicated to N.W. Timofeeff-Ressovsky and the 70th anniversary of “On the Nature of Gene Mutations and Gene Structure” by N.W. Timofeeff-Ressovsky, K.G. Zimmer, and M. Delbrück (Yerevan, 2005),
- International alumni seminar on “Biotechnology and Health” (Erevan, 2005),
- Международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО «Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики» (к 100-летию Н.М.Сисаяна) (Ереван-Аштарак, 2007),
- State-of-the-Art Biotechnology in Armenia and ISTC contribution (Tsakhadzor, 2008),
- International Conference “Biotechnology and Health”-2 and DAAD Alumni seminar (Erevan, 2008),
- The Joint International Symposium of 5th International Conference of Toxicogenomics (ICT) & 2nd Toxicogenomics Integrated Environmental Science (TIES) (Seoul, Korea, 2009),
- International Conference on Postgenomic Technology For Biomedicine (Novosibirsk, Russia, 2012).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 35 научных работ, в том числе 20 статей и 15 тезисов докладов на международных конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, 5 глав с изложением результатов собственных исследований, их обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 237 страницах текста, иллюстрирована 24 таблицами и 39 рисунками. Список цитированной литературы включает 512 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** обоснованы актуальность темы исследования, цель и задачи, научная новизна и практическая значимость работы, основные положения выносимые на защиту.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает подробный анализ принципов и методов тестирования генотоксикантов, характеристику механизмов действия изученных



соединений, данные о распределениях повреждений по геному и по клеткам и обоснование необходимости представленных исследований.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Исследованные соединения:

- $H_2O_2$  (Merck, Darmstadt, Germany)
- бутират – натриевая соль масляной кислоты  $Na(C_3H_7COO)$  (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, Germany)
- цис-диаминдихлорплатина (II) (цисплатин, *цис*-ДДП) (Sigma)
- митомицин С (Sigma–Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- блеомицин (Hexal AG, Germany)
- нитрилтриацетат железа (Fe-НТА) (приготовлен путем растворения 40 мг  $Fe(NO_3)_3$  (Sigma–Aldrich, Deisenhofen, Germany) в 10 мл дважды дистиллированной воды с последующим добавлением 23.5 мг нитрилтриацетата (НТА) (Sigma–Aldrich, Deisenhofen, Germany). pH раствора доведен до 7.4 добавлением  $NaHCO_3$ , конечная концентрация железа в растворе 10 мМ)
- *мезо*-тетра (4-N-бутилпиридил) порфирин (TBut4PyP(4)), Fe-производное *мезо*-тетра (4-N-бутилпиридил) порфирина (FeTButPyP(4)) и Co-производное *мезо*-тетра (4-N-оксизтилпиридил) порфирина (CoTOEPyP(4)), синтезированные на кафедре фармакологической химии ЕГМУ.

**Клеточные культуры и условия их культивирования.** Эксперименты проводили на лейкоцитах периферической крови здоровых доноров и трансформированных клеточных линиях: HT1080 (клетки фибросаркомы человека), CCRF-CEM (Т-клетки острой лимфоцитарной лейкемии человека), СНО (эпителиальные клетки яичников китайского хомячка) и HT29 (клетки аденокарциномы кишечника человека). Клетки линий HT1080, CCRF-CEM, СНО и HT29 культивировали в культуральных флаконах или в 6-луночных планшетах (Corning, New York, USA) в среде DMEM или RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% раствор пенициллина/стрептомицина в увлажненном (95%) инкубаторе в атмосфере с 5% содержанием  $CO_2$  при 37°C. Пересев клеток проводили каждые 2-3 суток в фазе экспоненциального роста. Периферическую кровь здоровых доноров с гепарином культивировали в питательной среде того же состава с добавлением 10 мкг/мл фитогемаглоитина.

**Обработка клеток исследованными соединениями.** Клетки обрабатывали  $H_2O_2$  и Fe-НТА в концентрациях, достоверно повышающих уровень повреждений ДНК, но не влияющих на жизнеспособность и скорость роста клеток [Glei et al., 2002, 2006; Knöbel et al., 2006] и бутиратом - в концентрациях, эффективно снижающих уровень индуцированных повреждений ДНК [Abrahamse et al., 1999; Knoll et al., 2005]. Концентрации БЛМ, ММС, *цис*-ДДП и порфиринов TButPyP(4), FeTButPyP(4) и CoTOEPyP(4) были выбраны на основе литературных данных [Pfulher and Wolf, 1996; Buschini et al., 2002] и результатов собственных исследований для получения дозовой зависимости при минимальном

цитотоксическом эффекте. Клетки также обрабатывались *цис*-ДПП и БЛМ совместно.

**Оценка жизнеспособности клеток.** Число жизнеспособных клеток оценивали методом исключения трипанового синего [Freshney, 2010].

**Микроядерный тест с блокированием цитокинеза.** МЯ тест с блокированием цитокинеза был проведен по рекомендациям, разработанным для лимфоцитов крови человека и клеточных линий [Kirsch-Volders et al., 2003; Fenech, 2000].

Для культивирования *лейкоцитов человека* использовали цельную кровь. Через 22 ч после начала культивирования добавляли мутаген (ММС в концентрации 0.1 мкг/мл). Через 44 ч культивирования вводили цитохалазин В (3 мкг/мл) для ингибирования деления цитоплазмы. После 72 ч культивирования клетки обрабатывали холодным гипотоническим раствором KCl (0.075 М) при +4°C в течение 3 мин. Эта процедура позволяет сохранять целостность клеточной мембраны, что необходимо для определения принадлежности микроядра к определенной клетке. Клетки фиксировали дважды в фиксаторе этанол/уксусная кислота (3:1) и раскапывали на предметные стекла. Препараты хранили при -20°C до реализации процедуры FISH.

*Клетки линии HT29* после завершения обработки исследованными соединениями инкубировали 36 ч с раствором цитохалазина В (3 мкг/мл). Затем клетки отделяли от поверхности лунок раствором трипсин-EDTA (Gibco BRL, Paisley, UK), собирали в растворе PBS и фиксировали дважды в растворе этанол/уксусная кислота (3:1) в течение 20 и 10 мин, соответственно. Суспензию клеток раскапывали на предметные стекла (по два препарата на экспериментальный вариант), высушивали на воздухе и окрашивали красителем Гимза (Sigma–Aldrich) (4%) 15 мин.

**Подсчет микроядер и индекса пролиферации (ИП).** Микроядра идентифицировали по критериям, предложенным Fenech [2000], на основе их диаметра и способности окрашиваться. Микроядра анализировали в 1000 двуядерных клеток в двух повторностях (2000 клеток на экспериментальный вариант). Индекс пролиферации (ИП) подсчитывали на основе анализа 500 клеток на культуру с одним и более микроядром по формуле:  $ИП = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/N$ , где M1–M4 – количество клеток с 1–4 ядрами и N – общее количество проанализированных клеток [Fenech, 2000]. Оценивали среднее количество микроядер на 1000 двуядерных клеток и стандартное отклонение для двух независимых экспериментальных вариантов.

**Комбинация FISH с МЯ тестом.** Для анализа хромосомного состава микроядер технику FISH применяли на лимфоцитах крови одного донора женского пола и двух доноров мужского пола по стандартной схеме [Liehr et al., 1995]. Микроядра гибридизировали с центромерными пробамми (CEP, Abbott/Vysis, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Germany) для хромосом 3 (SpectrumOrange), 4 (SpectrumAqua), 6 (SpectrumOrange), 7 (SpectrumRed), 9 (SpectrumGreen), 16 (SE 16 [D16Z2]; Poseidon Satellite Enumeration Probes KREATECH Diagnostics, Amsterdam, The Netherlands), 17 (Diethylaminocoumarin), 18 (SpectrumGreen) и X (SpectrumOrange). Координаты микроядер регистрировали для последующей гибридизации микроядер с цельнохромосомными пробамми.

На втором этапе микроядра гибридизировали с цельнохромосомными пробами для 3 (SpectrumOrange), 4 (Cy5), 6 (SpectrumOrange), 7 (SpectrumGreen), 9 (SpectrumGreen), 16 (SpectrumGreen), 17 (Cy5), 18 (diethylaminocoumarin), женской X (SpectrumOrange) и мужской X (SpectrumGreen) хромосом. Цельнохромосомные пробы готовили в соответствии с рекомендациями [Liehr and Claussen, 2002]. Микроядра идентифицировали по критериям Fenech [2000]. Анализ и регистрацию изображений проводили с применением автоматической системы Isis (MetaSystems).

**Статистические методы анализа микроядер.** Достоверность различий результатов МЯ теста оценивали с использованием теста Стьюдента (t-тест) с использованием программы STATGRAPHICS Plus 2.1. Достоверными считали различия при  $p < 0.05$ . Статистическую обработку результатов, полученных при комбинации МЯ теста с FISH проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 19 с применением корреляции Пирсона, двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и теста  $\chi^2$ .

**Стандартная версия метода ДНК-комет.** Для оценки повреждений ДНК применяли метод электрофореза единичных клеток (метод ДНК-комет) в щелочных условиях [Singh et al., 1988; Tice et al., 2000].

На предметные стекла (Labcraft, London, UK), предварительно покрытые 1% раствором агарозы с нормальной плавкостью (Type II; Sigma-Aldrich) в фосфатно-солевом буфере (PBS), наносили 90 мкл смеси, содержащей 8 мкл цельной крови или суспензии клеток HT1080, или CCRF-CEM, или CHO и 82 мкл 0.9% легкоплавкой агарозы (LMA, Type VII; Sigma-Aldrich). Для затвердевания второго слоя агарозы препараты выдерживали 10 мин при 4°C. После снятия покровных стекол, препараты погружали в лизирующий раствор (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 2.5 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 10) на 1 ч при 4°C. После лизиса препараты погружали в камеру для горизонтального электрофореза, содержащую щелочной буфер (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mM NaOH, pH 13.1) и оставляли без включения тока на 20 мин при 4°C для раскручивания цепей ДНК с целью выявления щелочно-лабильных сайтов. Затем проводили электрофорез при 1.25 В/см, 300 мА в течение 25 мин. После электрофореза препараты однократно промывали нейтрализационным буфером (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5 или 0.08 M Tris base, pH 7.2) 10 мин и окрашивали SybrGreen (1 мкл/мл, 30 мкл на слайд) или бромистым этидием (20 мкл/мл, 30 мкл на слайд). На период просмотра препараты хранили во влажной камере при 4°C.

**Модифицированная клеточная и неклеточная версии метода ДНК-комет.** Для оценки повреждений ДНК также применяли модифицированную клеточную и неклеточную версии метода ДНК-комет [Kiffe et al., 2003]. В модифицированной версии, в отличие от стандартной, действию изучаемых соединений подвергали клетки, иммобилизованные в слое агарозы до (модифицированная клеточная версия) или после (модифицированная неклеточная версия) лизиса. Растворы исследуемых соединений (порфиринов) расквашивали непосредственно на клетки на предметных стеклах, накрывали покровными стеклами и помещали в термостат на период обработки (2 ч). После завершения обработки клетки отмывали от порфиринов раствором 1xSSC.

Дальнейшие процедуры проводили по схеме стандартной версии метода ДНК-комет.

**Анализ изображений комет.** Повреждения ДНК анализировали на флуоресцентном микроскопе Zeiss AxioPlan, снабженном ртутной лампой HBO 50 и соответствующим набором фильтров. Изображения комет регистрировали видеокамерой Variocam, PCO, Germany и анализировали с применением программ Komet 4 (Kineticimaging, UK) и CASP [Końca et al., 2003]. Уровень повреждений ДНК оценивали на основе регистрации % ДНК в хвосте кометы, соотношения длины кометы к ее высоте (L/H) и момента хвоста Оливе (Olive Tail Moment, OTM), равного произведению расстояния от центра ядра до центра плотности хвоста кометы на % ДНК в хвосте [Olive et al., 1990, 1992].

**Комбинация FISH с методом ДНК-комет.** Препараты готовили так же, как для стандартной версии метода ДНК-комет, за исключением процедуры окраски. Перед гибридизацией препараты хранили не менее 3 дней в абсолютном этаноле при 4°C для дегидратации. Гель регидратировали в воде в течение 15 мин, затем ДНК денатурировали в растворе 0.5 М NaOH в течение 25 мин. Денатурированную ДНК дегидратировали в серии растворов этанола (75, 80 и 95%, по 5 мин в каждом), затем препараты высушивали на воздухе до полного испарения этанола. Теломерные PNA пробы (Telomere PNA FISH kit/Су3; DakoCytomation, Denmark) применяли по инструкции производителя. Так как совместная тепловая денатурация проб и препаратов на агарозном геле невозможна, пробы денатурировали отдельно путем нагрева до 60°C, наносили на поверхность препаратов и помещали на ночь во влажную камеру при 37°C для гибридизации. На следующий день слайды, выдержанные при комнатной температуре в течение 30 мин, обрабатывали специальным раствором, облегчающим снятие покровных стекол. Затем препараты отмывали 2,5 мин при 65°C в специальном растворе (из PNA FISH kit/Су3), а затем в холодном 1xPBD. Для фоновой окраски применяли раствор 1:2000 SybrGreen (Molecular Probes, Germany) включающий 50% антифада. Для каждой клетки регистрировали число теломерных сигналов и их локализацию в голове или хвосте кометы.

**Анализ изображений комет с теломерными сигналами.** Для *анализа повреждений теломер* рассчитывали процентное содержание теломерных сигналов в хвосте и голове комет. Для *контроля эффективности гибридизации* изображения комет анализировали на трехмерном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 510. В каждом варианте для анализа были выбраны 50 комет с наибольшей эффективностью гибридизации. Для *проверки эффекта процедуры гибридизации* специальным образом отмеченные изображения комет были локализованы до гибридизации и релокализованы после нее. Процент ДНК в хвосте оценивали до и после гибридизации программой Komet 4.

**Статистические методы анализа комет.** Достоверность различий данных, полученных методом ДНК-комет, оценивали непараметрическим тестом *Манна-Уитни*. Для сравнения уровней повреждений всей ДНК и теломерных участков, полученных при комбинации метода ДНК-комет с FISH, применяли регрессионный анализ. Распределения, отражающие частоту комет с разными уровнями повреждения ДНК, были построены с применением программы IBM SPSS Statistics 19.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Оценка мутагенных и протекторных эффектов пищевых компонентов МЯ тестом с блокированием цитокинеза

Оценка мутагенных и протекторных свойств пищевых компонентов *in vitro* необходима для разработки сбалансированных и безопасных для здоровья диет. С целью изучения компонентов пищи, как способствующих, так и предотвращающих риск развития опухолей кишечника, мутагенные эффекты нитрилтриацетата железа (Fe-НТА) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), моделирующих избыток железа и окислительный стресс, оценивали с применением МЯ теста с блокированием цитокинеза в клеточной линии аденомы кишечника HT29. Протекторный эффект бутирата, продукта ферментативной переработки пищевых волокон кишечной микрофлорой, в физиологических для кишечника человека концентрациях [Topping and Clifton, 2001], изучали по отношению к мутагенному действию Fe-НТА и  $H_2O_2$ . Мутагенную и протекторную активность изучаемых соединений оценивали в отсутствие цитотоксических эффектов, что было показано путем определения жизнеспособности клеток методом исключения трипанового синего (табл. 1-3).

**Уровень микроядер в клетках линии HT29, обработанных бутиратом и  $H_2O_2$ .** При обработке клеток  $H_2O_2$  в концентрациях 37, 75 и 150 мкМ в течение 0.5 и 1 ч уровень микроядер достоверно повышается в зависимости от дозы (табл. 1). Для оценки протекторной активности бутирата клетки обрабатывали  $H_2O_2$  в концентрации 75 мкМ в течение 0.5 ч. Предобработка клеток бутиратом в концентрациях 2, 4, и 10 мМ в течение 15 мин достоверно снижает индуцированный  $H_2O_2$  уровень микроядер (табл. 2). Предобработка клеток бутиратом (4 мМ) в течение 24 ч также приводит к снижению уровня индуцированных  $H_2O_2$  микроядер от  $17.5 \pm 2.12$  до  $8.50 \pm 3.54$  на 1000 двуядерных клеток ( $p < 0.05$ ). Сам бутират в исследованных концентрациях негеноотоксичен для клеток HT29 (табл. 2 и 3).

**Уровень микроядер в клетках линии HT29, обработанных бутиратом и Fe-НТА.** Fe-НТА в концентрациях 500 и 1000 мкМ значимо повышает уровень микроядер в клетках HT29. Предобработка клеток бутиратом в концентрациях 2 и 4 мМ в течение 15 мин достоверно снижает уровень микроядер, индуцированных Fe-НТА (табл. 3). Предобработка бутиратом в концентрации 4 мМ в течение 24 ч также достоверно снижает уровень микроядер, индуцированных Fe-НТА (500 мкМ) от  $23.0 \pm 5.7$  до  $5.0 \pm 1.4$  на 1000 двуядерных клеток ( $p < 0.05$ ). 24-часовая предобработка бутиратом (2 и 4 мМ) также приводит к снижению уровня микроядер, индуцированных Fe-НТА (1000 мкМ), от  $19.0 \pm 1.4$  до  $3.5 \pm 2.1$  ( $p < 0.01$ ) и  $11.0 \pm 1.4$  на 1000 двуядерных клеток ( $p < 0.05$ ), соответственно.

**Пролиферативная активность клеток линии HT29, обработанных бутиратом,  $H_2O_2$  и Fe-НТА.** Ни в одном из вариантов обработки значения индекса пролиферации (ИП) в клетках HT29 достоверно не отличаются от контрольного уровня (табл. 1-3), что согласуется с результатами оценки жизнеспособности клеток методом исключения трипанового синего.

**Таблица 1.**

Уровень микроядер в клетках линии НТ29, обработанных перекисью водорода ( $H_2O_2$ ).

Варианты обработки	Уровень МЯ на 1000 двуядерных клеток (%) ( $M \pm \sigma$ ) <sup>a</sup>	Индекс клеточного деления ( $M \pm \sigma$ ) <sup>a</sup>	Число жизнеспособных клеток (%) ( $M \pm \sigma$ ) <sup>a</sup>
<b><math>H_2O_2</math> (мкМ), 0.5 ч обработки</b>			
37	$11.0 \pm 2.83^*$	$1.53 \pm 0.12$	$93.19 \pm 0.28$
75	$22.5 \pm 0.71^{***}$	$1.50 \pm 0.11$	$93.35 \pm 0.77$
150	$25.5 \pm 3.54^*$	$1.47 \pm 0.04$	$85.04 \pm 0.21$
<b><math>H_2O_2</math> (мкМ), 1 ч обработки</b>			
37	$11.5 \pm 3.55^*$	$1.52 \pm 0.11$	$89.36 \pm 0.15$
75	$19.5 \pm 0.71^{***}$	$1.51 \pm 0.06$	$84.19 \pm 2.35$
150	$22.5 \pm 2.12^{**}$	$1.43 \pm 0.11$	$83.63 \pm 2.15$
Позитивный контроль (ММС)	$35.5 \pm 3.54^{**}$	$1.34 \pm 0.21$	$87.32 \pm 3.05$
Негативный контроль (DMEM)	$3.5 \pm 0.71$	$1.50 \pm 0.11$	$94.61 \pm 0.98$

<sup>a</sup> M – среднее,  $\sigma$  – стандартное отклонение

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  - достоверная разница с негативным контролем.

**Таблица 2.**

Влияние бугирата на уровень индуцированных перекисью водорода ( $H_2O_2$ ) микроядер в клетках линии НТ29.

Варианты обработки	Уровень МЯ на 1000 двуядерных клеток (%) ( $M \pm \sigma$ ) <sup>a</sup>	Индекс клеточного деления ( $M \pm \sigma$ ) <sup>a</sup>	Число жизнеспособных клеток (%) ( $M \pm \sigma$ ) <sup>a</sup>
<b>Бугират (мМ), 15 мин обработки</b>			
2	$3.5 \pm 0.71$	$1.51 \pm 0.03$	$89.81 \pm 0.51$
4	$4.5 \pm 0.71$	$1.41 \pm 0.01$	$90.29 \pm 1.28$
10	$5.5 \pm 2.12$	$1.49 \pm 0.10$	$90.57 \pm 1.73$
15	$4.5 \pm 3.54$	$1.50 \pm 0.02$	$90.03 \pm 0.88$
$H_2O_2$ (75 мкМ), 0.5 ч обработки	$18 \pm 0.00^{**}$	$1.49 \pm 0.13$	$93.28 \pm 4.72$
<b>Бугират (мМ) + <math>H_2O_2</math> (мкМ)</b>			
2 + 75	$5.5 \pm 0.71^a$	$1.50 \pm 0.08$	$88.42 \pm 1.05$
4 + 75	$9.0 \pm 1.41^a$	$1.53 \pm 0.07$	$86.51 \pm 6.07$
10 + 75	$9.5 \pm 0.71^a$	$1.52 \pm 0.01$	$89.10 \pm 0.92$
15 + 75	$10.5 \pm 3.54$	$1.46 \pm 0.21$	$89.29 \pm 4.89$
Позитивный контроль (ММС)	$21.5 \pm 2.12^{**}$	$1.39 \pm 0.01$	$88.80 \pm 3.54$
Негативный контроль (DMEM)	$2.5 \pm 0.71$	$1.59 \pm 0.03$	$94.65 \pm 0.75$

<sup>a</sup> M – среднее,  $\sigma$  – стандартное отклонение

\*\* $p < 0.01$  - достоверная разница с негативным контролем, <sup>a</sup> $p < 0.01$  - достоверная разница по сравнению с обработкой  $H_2O_2$ .

Таблица 3.

Влияние бутирата на уровень индуцированных нитрилтриацетатом железа (Fe-НТА) микроядер в клетках линии НТ29.

Варианты обработки	Уровень МЯ на 1000 двуядерных клеток (%) (M±σ) <sup>a</sup>	Индекс клеточного деления (M±σ) <sup>a</sup>	Число жизнеспособных клеток (%) (M±σ) <sup>a</sup>
Бутират (мМ), 15 мин обработки			
2	4.5 ± 0.71	1.63 ± 0.07	94.90 ± 0.24
4	2.5 ± 2.12	1.92 ± 0.06	87.80 ± 0.46
Fe-НТА (мкМ), 15 мин обработки			
500	16.0 ± 1.41*** <sup>a</sup>	1.67 ± 0.01	88.29 ± 2.39
1000	21.5 ± 0.71*** <sup>a</sup>	1.63 ± 0.07	89.51 ± 2.31
Бутират (мМ) + Fe-НТА (мкМ)			
2 + 500	8.0 ± 1.41 <sup>b</sup>	1.61 ± 0.03	89.02 ± 1.41
2 + 1000	4.5 ± 2.12 <sup>b</sup>	1.61 ± 0.01	88.12 ± 0.18
4 + 500	12.5 ± 0.71 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.01	86.18 ± 1.47
4 + 1000	11.0 ± 4.24 <sup>b</sup>	1.64 ± 0.00	88.09 ± 2.47
Контроль-растворитель (НТА) (мкМ)			
500	6.0 ± 1.41	1.57 ± 0.07	90.49 ± 0.87
1000	7.0 ± 1.41*	1.65 ± 0.01	88.69 ± 0.68
Позитивный контроль (ММС)	21.5 ± 0.71***	1.33 ± 0.14	87.85 ± 0.49
Негативный контроль (DMEM)	3.5 ± 0.71	1.71 ± 0.23	94.25 ± 2.64

<sup>a</sup> M – среднее, σ – стандартное отклонение

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  - достоверная разница с негативным контролем,

<sup>a</sup> $p < 0.01$  - достоверная разница с контролем – растворителем (НТА), <sup>b</sup> $p < 0.05$  - достоверная разница по сравнению с обработкой Fe-НТА.

Полученные результаты свидетельствуют о способности бутирата защищать клетки НТ29 от индуцированных Fe-НТА и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> хромосомных повреждений. Ранее было показано, что бутират повышает токсикологическую защиту в клетках кишечника, в частности, путем снижения уровня повреждений ДНК в методе ДНК-комет *in vitro* [Abrahamse et al., 1999; Knoll et al., 2005; Rosignoli et al., 2001, 2008] и *in vivo* [Toden et al., 2007]. В нашем исследовании способность бутирата защищать клетки кишечника человека от индуцированных пищевыми мутагенами Fe-НТА и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> хромосомных повреждений *in vitro* подтверждена в МЯ тесте, который широко применяют для оценки генотоксичности пищевых компонентов *in vitro* и *in vivo* [Loprieno et al., 1991; Tucker et al., 1993; Fenech and Rinaldi, 1995; Fenech, 1998; 2002]. Отсутствие генотоксичности бутирата в концентрациях до 15 мМ в МЯ тесте согласуется с данными, полученными ранее методом ДНК-комет [Knoll et al., 2005]. Данные о протекторной активности физиологических концентраций бутирата по отношению к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированным микроядрам согласуются с результатами анализа комет в нормальных колоноцитах человека и в клетках НТ29 и НТ29 19А [Rosignoli et al., 2001].

Механизм протекторного эффекта бутирата может быть обусловлен повышением активности глутатион S-трансферазы, которая обезвреживает мутагены [Pool-Zobel et al., 2005]. Так как результаты свидетельствуют о способности бутирата защищать клетки от оксидативных повреждений, что согласуется с данными [Rosignoli et al., 2001], можно предположить, что бутират может влиять на репарацию ДНК и антиоксидантные системы клетки.

### 3.2. Локализация мишеней мутагенных эффектов с применением сочетания МЯ теста с техникой FISH

Для локализации мишеней мутагенного действия MMC на хромосомах был применен МЯ тест с блокированием цитокинеза в сочетании с FISH, позволяющий различать микроядра, образованные при потере целых хромосом и при их фрагментации, а также определять хромосомный состав микроядер [Leach and Jackson-Cook 2001; Norppa and Falck 2003].

Для оценки наличия материала хромосом 3, 4, 6, 7, 9, 16, 17, 18 и X, составляющих 40.8% всего генома [Scherer, 2010], в MMC-индуцированных микроядрах в лейкоцитах человека была осуществлена поэтапная флуоресцентная гибридизация с центромерными и цельнохромосомными пробами. Результаты FISH-анализа хромосомного состава MMC-индуцированных микроядер в двуядерных цитокинез-блокированных клетках приведены в таблице 4. На рис. 1 и 2 представлены изображения двуядерных клеток с микроядрами, содержащими материал хромосом 7 и 17.

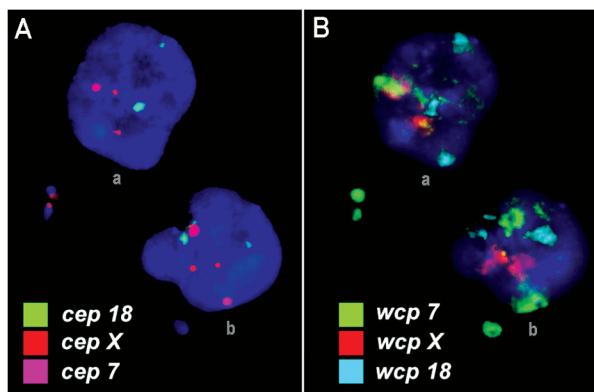
**Таблица 4.**

Частота микроядер с центромерными и цельнохромосомными сигналами в лейкоцитах человека, экспонированных MMC. Длина, плотность генов и локализация хромосом 3, 4, 6, 7, 9, 16, 17, 18 и X в интерфазном ядре.

Хромосома	Локализация хромосомы в ядре*	Длина хромосомы (Мб)**	Плотность генов (число генов на Мб)**	Всего микроядер с центромерными пробами	Микроядра с центромерными сигналами (%)	Всего микроядер с цельнохромосомными пробами	Микроядра с цельнохромосомными сигналами (%)
3	периферическая	198.0	5.20	1416	6 (0.42%)	1416	21 (1.48%)
4	периферическая	191.2	3.77	1416	5 (0.35%)	1416	18 (1.27%)
6	центральная	171.1	5.86	1732	16 (0.92%)	994	22 (2.21%)
7	периферическая	159.1	5.37	1202	9 (0.74%)	916	19 (2.07%)
9	периферическая	141.2	5.30	1732	53 (3.06%)	994	314 (31.60%)
16	центральная	90.4	8.67	1416	3 (0.21%)	1416	43 (3.04%)
17	центральная	81.2	13.68	1732	8 (0.46%)	994	16 (1.61%)
18	периферическая	78.1	3.29	1202	15 (1.24%)	916	19 (2.07%)
X(жен)	периферическая	155.3	5.19	1202	26 (2.16%)	916	39 (4.25%)
X(муж)	периферическая	155.3	5.19	-	-	916	9 (0.99%)

\* Данные Manvelyan *et al.* (2008), \*\* данные Scherer (2010).

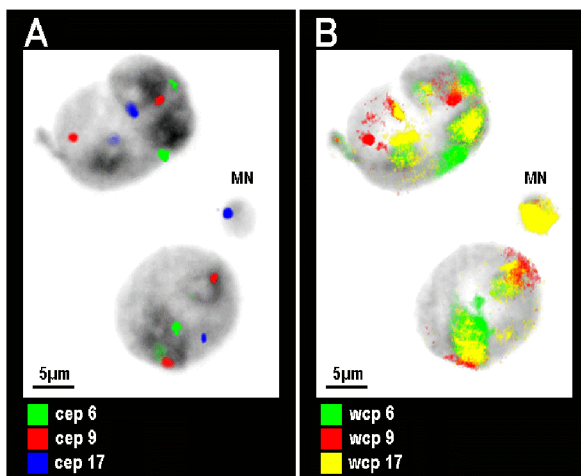




**Рис. 1.** Двухклеточная клетка с тремя микроядрами, окрашенная в трехцветный FISH с центромерными пробами (А) и целнохромосомными пробами для хромосом 7, 18 и X (В).

А. Два микроядра содержат центромерный материал хромосомы 7.

В. Два микроядра содержат материал хромосомы 7. В третьем микроядре содержится материал хромосомы 7 при отсутствии центромерного сигнала.



**Рис. 2.** Двухклеточная клетка с микроядром, окрашенная в трехцветный FISH с центромерными (А) и целнохромосомными пробами для хромосом 6, 9 и 17 (В).

А. Микроядро содержит центромерный материал хромосомы 17.

В. Микроядро содержит материал хромосомы 7.

**Количество и соотношение центромерных сигналов и цельнохромосомных сигналов в микроядрах.** ММС-индуцированные микроядра содержат в основном материал хромосом 9 (31.60%), X (4.25%) в микроядрах женских клеток и 16 (3.04%). Материал других хромосом был обнаружен только в 0.99 - 2.21% микроядер. Микроядра с цельнохромосомными сигналами обнаруживаются в 2-10 раз чаще, чем микроядра с соответствующими центромерными сигналами.

**Зависимость включения хромосом в микроядра от их длины, локализации в ядре и плотности генов.** Характер распределения поврежденных по хромосомам анализировали на основе оценки зависимости частоты их включения в микроядра от длины, плотности генов [Scherer, 2010] и локализации в интерфазном ядре [Manvelyan et al., 2008] с применением корреляционного анализа Пирсона. При анализе допускалось, что распределение поврежденных по геному является случайным, если количество поврежденных пропорционально длине хромосомы (или содержанию ДНК в хромосоме). Для определения факторов, влияющих на характер неслучайного распределения поврежденных, оценивали зависимость уровня поврежденных хромосом (или частоты включения хромосом в микроядра) от плотности генов на хромосоме и ее позиции в ядре. Результаты свидетельствуют об отсутствии статистически значимой корреляции между частотой микроядер с цельнохромосомными сигналами и длиной хромосом ( $r=-0.011$ ), локализацией (периферической или центральной) хромосом в ядре ( $r=0.246$ ), и плотностью генов ( $r=-0.117$ ) ( $p>0.05$  для всех случаев). Также не обнаружена достоверная корреляция между частотой микроядер с центромерными сигналами и локализацией (периферической или центральной) хромосом в ядре ( $r=0.416$ ), длиной хромосом ( $r=0.006$ ), а также плотностью генов ( $r=-0.303$ ) ( $p>0.05$  для всех случаев).

Таким образом, выявлен неслучайный характер распределения поврежденных по хромосомам, однако ни плотность генов, ни локализация в ядре не были идентифицированы как факторы, определяющие характер этого распределения.

Комбинированное действие двух факторов (локализации в ядре и длины хромосомы, локализации в ядре и плотности генов, длины хромосомы и плотности генов) на характер распределения поврежденных оценивали с применением двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Показано отсутствие взаимодействия между локализацией в ядре и длиной хромосомы в экспериментах с центромерными пробами ( $F(1,5)=0.073$ ,  $p=0.798$ ) и цельнохромосомными пробами ( $F(1,5)=0.102$ ,  $p=0.763$ ). Для других комбинаций факторов анализ был невозможен. Таким образом, анализ корреляции Пирсона и двухфакторный дисперсионный анализ свидетельствуют об отсутствии влияния локализации хромосом в ядре, длины хромосом и плотности генов на частоту включения целых хромосом и их фрагментов в микроядра.

Зависимость частоты включения *каждой из изученных хромосом* в микроядра от ее длины оценивали с применением теста  $\chi^2$ . Наблюдаемые и ожидаемые частоты миграции хромосом в микроядра представлены на рис. 3, где ожидаемые частоты рассчитаны на основе модели случайного распределения поврежденных хромосом [Scherer, 2010]. Отклонение наблюдаемых значений от ожидаемых отмечены для хромосом 3 ( $\chi^2=57.54$ ;  $p<0.001$ ), 4 ( $\chi^2=59.37$ ;  $p<0.001$ ), 6 ( $\chi^2=20.96$ ;

$p < 0.001$ ), 7 ( $\chi^2=17.58$ ;  $p < 0.001$ ) и 17 ( $\chi^2=3.95$ ;  $p < 0.05$ ), которые представлены в микроядрах с частотой ниже ожидаемой и для хромосомы 9 ( $\chi^2=1684.27$ ;  $p < 0.001$ ), которая представлена в микроядрах с частотой выше ожидаемой. Хромосомы 16, 18 и X в женских клетках встречаются в микроядрах в 1.05 чаще, в 1.22 и 1.18 реже ожидаемого уровня, соответственно; однако отмеченная разница не является достоверной ( $\chi^2=0.09$ ,  $\chi^2=0.72$  и  $\chi^2=1.12$ ;  $p > 0.05$  для всех случаев). В мужских клетках X хромосома представлена в микроядрах с частотой ниже ожидаемой ( $\chi^2=31.12$ ;  $p < 0.001$ ). Частота включения *всех девяти хромосом* в микроядра также достоверно отличается от ожидаемой ( $\chi^2=1845.33$ ;  $p < 0.001$ ).

Относительно высокая частота встречаемости хромосом 9 и 16 в микроядрах может быть обусловлена их чувствительностью к действию ММС, выявленной методом хромосомного анализа [Cohen and Shaw, 1964; Morad et al., 1973; Brogger, 1977; Abdel-Halim et al., 2005; Sontakke and Fulzele, 2009] и МЯ тестом [Fauth et al., 2000]. Крупные перичентромерные гетерохроматиновые блоки хромосом 1, 9 и 16 являются “горячими точками” образования разрывов [Smith et al., 1998; Jefferson et al., 2010]. Гетерохроматиновые блоки хромосом 9q12, 1q12 и 16q12 являются специфическими мишенями действия ММС, вызывающего их деконденсацию в метафазе, повреждение и преимущественное включение материала этих хромосом в микроядра [Fauth et al., 2000]. Преимущественное повреждение гетерохроматиновых блоков хромосом 1, 9 и 16 и последующее их включение в состав микроядер также показаны в клетках, обработанных 5-азациитидином [Guttenbach and Schmid, 1994; Fauth et al., 1998], 2,6-диаминопурином [Smith et al., 1998] и идоксуридином [Fauth and Zankl, 1999]. Механизм фрагильности деконденсированных участков хромосом остается невыясненным, но может быть обусловлен деформацией закручивания, генерируемой движением хроматид к противоположным полюсам в анафазе [Smith et al., 1998]. Таким образом, структура хроматина является определяющим фактором неслучайного включения хромосом в ММС-индуцированные микроядра.

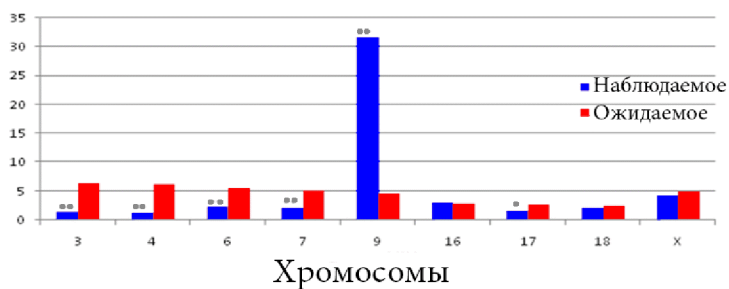
В наших исследованиях была обнаружена очевидная разница между частотой встречаемости микроядер с X хромосомой между мужскими (0.99%) и женскими клетками (4.25%), свидетельствующая в пользу гипотезы о преимущественном повреждении инактивной X хромосомы в женских клетках [Tucker et al., 1996].

Последовательное применение центромерных и цельнохромосомных проб на одних и тех же препаратах позволило различить микроядра, включающие целые хромосомы и хромосомные фрагменты. Число микроядер с цельнохромосомными сигналами превышает число микроядер с центромерными сигналами во всех вариантах. Таким образом, кластоген ММС преимущественно индуцирует образование микроядер с хромосомными фрагментами. Однако для ММС также характерен слабо выраженный анеугенный эффект, обусловленный его способностью разрушать кинетохоры [Renzi et al. 1996]. Способность ММС повреждать центромерные участки хромосом также объясняет образование микроядер с центромерными сигналами.

Полученные данные свидетельствуют о неслучайном распределении индуцированных ММС цитогенетических повреждений в лейкоцитах человека. Согласно результатам исследования, вероятность включения хромосом в

микроядра определяется главным образом спецификой действия ММС на определенные участки хромосом человека и, таким образом, обусловлена структурой хроматина.

Схожие закономерности формирования ММС-индуцированных хромосомных aberrаций (по данным литературы) и ММС-индуцированных микроядер (по данным наших экспериментов) подтверждают, что данные цитогенетического анализа индуцированных мутагенами повреждений в МЯ тесте, адекватно отражают результаты анализа хромосомных aberrаций. Таким образом, комбинированное применение FISH с МЯ тестом позволяет идентифицировать мишени действия мутагенов на хромосомах и может применяться для оценки действия различных мутагенных факторов.



**Рис. 3.** Наблюдаемые и ожидаемые частоты включения хромосом в микроядра, индуцированные ММС, рассчитанные с применением цельнохромосомных проб.

### 3.3. Оценка генотоксических эффектов противоопухолевых препаратов в стандартной и модифицированной версиях метода ДНК-комет.

Цитостатики действуют в основном посредством повреждения ДНК. Разработка схем их эффективного применения включает оценку побочных эффектов действия на нормальные клетки, обуславливающих риск развития вторичных опухолей [Ferguson and Pearson, 1996] и чувствительности трансформированных клеток различного происхождения к лекарственным препаратам [Spanswick et al., 2002; Ball et al., 1999; Huang et al., 1998]. Оценка генотоксичности является обязательным этапом проверки новых лекарственных соединений на стадии их предклинического тестирования [The International Conference on Harmonization (ICH) guidelines, 1997].

В нашем исследовании генотоксичность широко применяемых в клинике цитостатиков с различными механизмами действия на ДНК - блеомицина (БЛМ), митомицина С (ММС) и *цис*-диаминдихлорплатина(II) (*цис*-платин, *цис*-ДДП) оценивали в нормальных (лейкоциты периферической крови человека) и трансформированных (HT1080, CCRF-CEM и CHO) клетках. Генотоксичность новых аналогов порфиринов (TButPyP(4), FeTButPyP(4) и CoTOEPyP(4)) изучали в нормальных лейкоцитах человека в интактных клетках и в неклеточной системе

с целью локализации мишеней их действия в клетке и оценки распределения повреждений ДНК по клеткам.

**Повреждения ДНК, индуцированные ММС и БЛМ в лейкоцитах человека.** Уровни повреждений ДНК, индуцированных цитостатиками ММС и БЛМ, изучены в лейкоцитах периферической крови человека (рис. 4). В контрольных вариантах преобладают кометы с низким уровнем повреждений ДНК (7.5 % ДНК в хвосте). *БЛМ* в концентрациях до 25 МЕ/мл вызывает линейное дозо-зависимое повышение уровня повреждений ДНК, который практически не изменяется при повышении концентрации до 100 МЕ/мл. *ММС* в концентрациях 25 и 50 мкг/мл приводит к повышению, а начиная с концентрации 50 мкг/мл - к понижению % ДНК в хвосте.

БЛМ и ММС имеют разные механизмы действия на ДНК. Радиомиметик БЛМ обладает уникальным свойством повреждать ДНК посредством генерации свободных радикалов, индуцируя смесь одно- и двунитевых разрывов ДНК и апуриновых-апиримидиновых сайтов. При этом свободные радикалы целенаправленно атакуют дезоксирибозу на обеих нитях ДНК [Kemsley et al., 2003]. БЛМ в нормальных лимфоцитах человека индуцирует преимущественно однонитевые разрывы в низких концентрациях и вызывает резкое повышение количества двунитевых разрывов в высоких концентрациях [Benitez-Bribiesca and Sanchez-Suarez, 1999]. Действие ММС на ДНК обусловлено образованием спивков [Yang and Wang, 1999], однако при действии ММС образуются не только спивки, но и разрывы ДНК, в связи с чем интерпретация результатов анализа комет для клеток, обработанных ММС, вызывает определенные затруднения. Образование разрывов ДНК объясняется способностью ММС после редуктивной биоактивации генерировать перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксил-радикалы [Dott, 1988], а метод ДНК-комет является очень чувствительным для выявления  $H_2O_2$ -индуцированных разрывов ДНК [Fairbairn et al., 1995]. Повышение уровня миграции ДНК в методе комет было показано при обработке клеток крови человека ММС в концентрациях 100-800 мМ [Pfulher and Wolf, 1996].

Таким образом, регистрируемые методом ДНК-комет БЛМ-индуцированные повреждения ДНК, обусловлены генерацией одно- и двунитевых разрывов. Увеличение миграции ДНК в хвост кометы при действии ММС, свидетельствующее об образовании разрывов ДНК, опосредовано действием  $H_2O_2$ . Перелом в дозовой зависимости при действии ММС от повышения уровня миграции ДНК в хвост кометы к его понижению объясняется способностью ММС вызывать как разрывы, так и спивки ДНК. Начиная с концентрации ММС 50 мкг/мл, преобладание спивков над разрывами приводит к задержке миграции ДНК.

**Повреждения ДНК, индуцированные *цис*-ДДП и БЛМ в лейкоцитах человека.** Цитотоксические и мутагенные свойства противоопухолевого препарата *цис*-ДДП обусловлены образованием спивков ДНК между пуринами [Bradley et al., 1993; Kelland, 2007]. Спивки ДНК-ДНК, могут оцениваться щелочным методом ДНК-комет [Pfulher and Wolf, 1996]. При наличии разрывов ДНК нарушается структурная организация хроматина, формируются фрагменты ДНК, которые в электрическом поле вытягиваются по направлению к аноду [Сорочинская, Михайленко, 2008]. Спивки ДНК препятствуют миграции ДНК

при электрофорезе. Для оценки формирования сшивок, индуцируют разрывы ДНК и определяют задержку обусловленной ими миграции ДНК в хвост кометы. В нашем исследовании для оценки индуцированных *цис*-ДДП сшивок ДНК, разрывы ДНК индуцировали БЛМ. Интерес к оценке совместного действия отмеченных цитостатиков обусловлен тем, что комбинированная терапия *цис*-ДДП и БЛМ принята в медицинской практике. Оптимальные концентрации *цис*-ДДП и БЛМ были определены на основании данных литературы и результатов собственных исследований. Образование сшивок *цис*-ДДП оценивали по снижению БЛМ-индуцированной миграции ДНК в хвост кометы.

Уровни повреждений ДНК в лейкоцитах человека, обработанных БЛМ и *цис*-ДДП раздельно и совместно, представлены на рис. 4. Повреждения ДНК оценивали по критерию % ДНК в хвосте кометы. *Цис*-ДДП ( $3 \cdot 10^{-4}$  М) снижает контрольный уровень повреждений ДНК от  $7.5 \pm 0.2$  до  $4.8 \pm 0.4$  % ДНК в хвосте. Совместная обработка *цис*-ДДП с БЛМ (12.5 и 25 МЕ/мл) вызывает значимое снижение БЛМ-индуцированной миграции ДНК в хвост комет. При обработке *цис*-ДДП с БЛМ в концентрации 100 МЕ/мл % ДНК в хвосте незначительно повышается (от  $38.2 \pm 0.3$  до  $42.4 \pm 0.2$ ). Отсутствие задержки миграции ДНК в этом случае может быть обусловлено побочным цитотоксическим эффектом, вызванным совместным действием *цис*-ДДП с БЛМ в высокой концентрации.

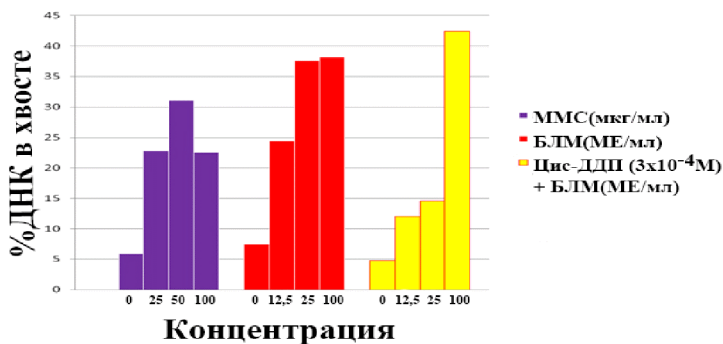


Рис. 4. Уровни повреждений ДНК в кометах, индуцированных БЛМ, ММС и *цис*-ДДП в лейкоцитах человека.

**Повреждения ДНК, индуцированные ММС и БЛМ в клеточных линиях HT1080, CCRF-CEM и CHO.** Метод ДНК-комет применяют для оценки повреждений ДНК при действии радиации и химических веществ в любых эукариотических клетках, в том числе трансформированных. Необходимость прогнозирования чувствительности опухолевых клеток к радиации и цитостатикам обусловлена тем, что резистентность к лекарствам является одной из важнейших проблем успешной лекарственной терапии. Метод ДНК-комет может также применяться для оценки повреждений ДНК в первичных клетках из материала биопсии [McKenna et al., 2008]. После разработки стандартного протокола и единых подходов к интерпретации данных, метод ДНК-комет может

быть внедрен в клиническую практику для индивидуального подбора лекарственных препаратов [McKenna et al., 2008].

Уровень повреждений ДНК при действии ММС и БЛМ оценивали в клетках фиброкарциномы человека HT1080, лейкемических Т-клетках человека CCRF-CEM и эпителиальных клетках яичников китайского хомячка CHO.

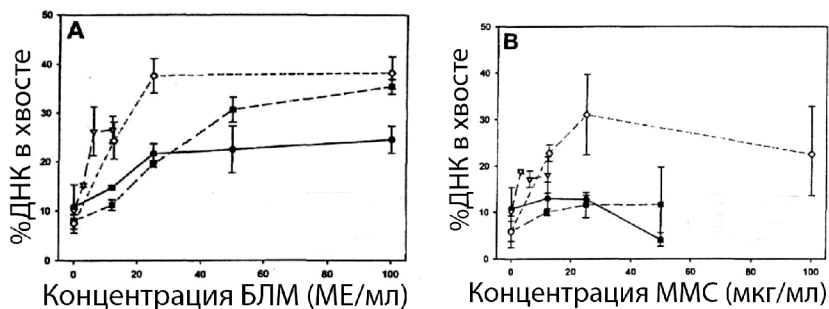
При действии БЛМ % ДНК в хвосте комет возрастает в зависимости от дозы во всех клеточных линиях (рис. 5А). Дозовая зависимость наиболее приближена к линейной при действии БЛМ на клетки HT1080. Наиболее чувствительными к действию БЛМ оказались клетки CHO, а наиболее устойчивыми - клетки CCRF-CEM.

ММС в дозах до 25 мкг/мл повышает уровень миграции ДНК в хвост кометы в клетках CCRF-CEM и HT1080, а, начиная с 25 мкг/мл, задерживает миграцию ДНК за счет образования спивок. В клетках CHO, которые оказались наиболее чувствительными к действию ММС, в концентрациях до 6 мкг/мл обнаружено повышение, а выше 6 мкг/мл – снижение уровня миграции ДНК (рис. 5В).

Высокая чувствительность клеток CHO к действию БЛМ и ММС обусловлена характерным для этих клеток дефектом репарационной системы [Thompson et al., 1980]. БЛМ и ММС индуцируют в нормальных лейкоцитах человека больше повреждений ДНК, чем в трансформированных линиях HT1080 и CCRF-CEM.

Кометы, индуцированные БЛМ и ММС, отчетливо различаются по форме. Индуцированные БЛМ длинные хвосты комет с низкой плотностью содержат относительно короткие фрагменты ДНК. ММС-индуцированные короткие хвосты комет с высокой плотностью содержат относительно крупные фрагменты ДНК.

Таким образом, разные клетки отчетливо различаются чувствительностью к БЛМ и ММС и характером дозовой зависимости. Полученные данные подтверждают способность метода ДНК-комет адекватно оценивать различия в чувствительности нормальных и опухолевых клеток разного тканевого происхождения к действию лекарственных препаратов [Spanswick et al., 2002; Ball et al., 1999; Huang et al., 1998].



**Рис. 5.** Дозовая зависимость уровня повреждений ДНК (% ДНК в хвосте), индуцированных БЛМ (А) и ММС (В) в клеточных линиях HT1080 (■), CCRF-CEM (●), CHO (▲) и нормальных лейкоцитах человека (○).

**Повреждения ДНК, индуцированные порфиринами в лейкоцитах человека в клеточной и неклеточной моделях.** Метод ДНК-комет эффективен на ранних этапах скрининга потенциальных лекарств, направленного на определение их генотоксичности, и даже рассматривается в качестве подхода, альтернативного трудоемким цитогенетическим тестам [Witte et al., 2007]. Одна из версий метода ДНК-комет позволяет оценивать повреждения ДНК в неклеточной системе [Kasamatsu et al., 1996]. При этом экспозицию клеток изучаемым соединением проводят после разрушения клеточной и ядерной мембран и большинства внутрядерных белков, что позволяет различать соединения, действующие на ДНК непосредственно и опосредованно, с участием клеточных структур. Применение неклеточной версии метода ДНК-комет целесообразно при изучении новых соединений с неизвестными механизмами действия.

Многие порфирины обладают противоопухолевыми свойствами, в связи с чем активно синтезируются и исследуются их новые аналоги. Способность новых соединений *мезо*-тетра-(4-N-бутилпиридил) порфирина (TButPyP(4)), Fe-производного *мезо*-тетра-(4-N-бутилпиридил) порфирина (FeTButPyP(4)) и Co-производного *мезо*-тетра-(4-N-оксипиридил) порфирина (CoTOEPyP(4)) повреждать ДНК в лейкоцитах человека изучена с применением стандартной и модифицированной (клеточной и неклеточной) версий метода ДНК-комет. В стандартной версии порфиринами обрабатывали суспензию интактных клеток, в модифицированной клеточной версии – интактные клетки, заключенные в слой агарозы до лизиса, а в модифицированной неклеточной версии – клетки, заключенные в слой агарозы после лизиса. Генотоксичность порфиринов определяли по параметрам: % ДНК в хвосте кометы, отношение длины кометы к ее высоте (L/H) и момент хвоста Оливе (ОТМ) (табл. 5).

Уровни повреждений ДНК, индуцированных TButPyP(4) ( $10^{-7}$  и  $10^{-6}$ М), в *стандартной версии* комет значительно отличаются от контроля. TButPyP(4) в концентрации  $10^{-5}$ М полностью разрушает ДНК. В связи с этим действие TButPyP(4) в *модифицированной версии* оценивали в концентрациях  $10^{-9}$ М,  $10^{-8}$  и  $10^{-7}$ М. TButPyP(4) повреждает ДНК в неклеточной системе активнее, чем в модифицированной клеточной, а в концентрации  $10^{-7}$ М вызывает полное разрушение ДНК в неклеточной системе.

FeTButPyP(4) повышает уровень повреждений ДНК в *стандартной версии комет* только в концентрации  $10^{-5}$ М. В *модифицированной клеточной модели* FeTButPyP(4) значимо повышает уровень разрывов ДНК во всех концентрациях. Уровень повреждений ДНК, индуцированных FeTButPyP(4) в *модифицированной неклеточной модели*, выше, чем *модифицированной клеточной* во всех экспериментальных вариантах. В неклеточной системе FeTButPyP(4) ( $10^{-5}$ М) полностью разрушает ДНК.

CoTOEPyP(4) достоверно повреждает ДНК в *стандартной* и *модифицированной клеточной* моделях только в концентрации  $10^{-3}$ М, однако уровень повреждений во второй версии значительно выше, чем в первой. В *неклеточной модели* CoTOEPyP(4) в концентрациях  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$ М значимо повышает уровень повреждений ДНК, а в концентрации  $10^{-5}$ М полностью разрушает ДНК.



Таким образом, оценка новых порфиринов в *стандартной версии метода ДНК-комет* свидетельствует об умеренной генотоксичности FeTButPyP(4) и CoTOEPyP(4) и о высокой генотоксичности TButPyP(4). Сравнительно высокая генотоксическая активность TButPyP(4) может быть обусловлена липофильной природой бутила, способствующей лучшему проникновению порфирина через клеточную мембрану. Добавление Fe в структуру TButPyP(4) приводит к существенному ослаблению его генотоксичности.

В *модифицированной клеточной версии метода ДНК-комет* порфирины индуцируют более высокий, чем в стандартных условиях, уровень разрывов ДНК. Аналогичные результаты, полученные при действии антоцианов на клетки карциномы кишечника человека, авторы объясняют меньшей эффективностью репарационных систем в клетках, заключенных в агарозу, по сравнению с клеточной культурой [Renis et al., 2008].

В *модифицированной неклеточной версии метода ДНК-комет*, исключаяющей влияние клеточных компонентов на образование или репарацию повреждений ДНК, уровень разрывов ДНК выше, чем в стандартной и модифицированной клеточной версиях. Известно, что порфирины способны взаимодействовать с «голой» молекулой ДНК путем интеркаляции или внешнего связывания [Marzilli, 1990; Bustamante et al., 1994; Sari et al., 1990]. CoTOEPyP(4) и FeTButPyP(4) внешне связываются с ДНК на АТ-обогащенных участках [Dalayan et al., 2001], TButPyP(4) в изученных концентрациях интеркалирует в сайты, обогащенные ГЦ. В неклеточной версии метода ДНК-комет воздействию тестируемых соединений подвергается нуклеоид - свободная от гистонов суперспирализованная ДНК в каркасе из РНК и протеинов [Блохин, Стручков, 1989]. Характер взаимодействия порфиринов с ДНК нуклеоида может совпадать с характером взаимодействия с «голой» ДНК. Заметное усиление степени фрагментации ДНК в неклеточной системе свидетельствует о возможности прямого взаимодействия порфиринов с ДНК, а также позволяет предположить, что внешнее связывание и интеркаляция могут приводить к формированию разрывов в наиболее чувствительных сайтах взаимодействия.

Индукция разрывов ДНК как в стандартной, так и в модифицированных клеточной и неклеточной версиях метода ДНК-комет свидетельствует о том, что порфирины являются *прямыми генотоксикантами*. В интактных клетках наличие клеточных барьеров и систем репарации существенно ослабляет эффект их действия. Порфирины различаются по механизмам взаимодействия с ДНК на разных уровнях структурной организации. Например, гематопорфирин при фотоактивации повреждает изолированную ДНК, но при этом не вызывает повреждений ДНК в нуклеопротеиновом комплексе и ДНК интактных HeLa клеток. В тех же условиях гематопорфирин вызывает гибель клеток HeLa. Таким образом, реактивные радикалы, генерируемые при фотоактивации, не способны достигать ДНК, находящуюся в белковой оболочке и в клеточном ядре [Egyeki et al., 2006].

В неклеточной модели формирование повреждений ДНК не зависит от гибели, деления и репарации клеток и миграция ДНК в хвост кометы обусловлена только воздействием генотоксикантов (наличием разрывов или спивок ДНК). Таким образом, результаты, полученные в неклеточной версии метода ДНК-

комет, позволяют более корректно оценивать природу генотоксичности тестируемых соединений. Сравнение результатов клеточной и неклеточной версий комет позволяет оценить роль клеточных компонентов и репарации в процессах мутагенеза, а также различать эффекты прямых и непрямых мутагенов (Gichner, 2003; Kasamatsu et al., 1996).

**Таблица 5.**

Уровни повреждений ДНК (% ДНК в хвосте, представленный в медианах), индуцированные порфиринами TButPyP(4), FeTButPyP(4) и CoTOEPyP(4) в лейкоцитах человека в стандартной и модифицированной (клеточной и неклеточной) версиях метода ДНК-комет. Статистический анализ проведен по тесту *Манна-Уитни*.

Обработка/Версии метода ДНК-комет		Стандартная	Модифицированная клеточная	Модифицированная неклеточная
TButPyP(4)				
Стандарт.	Модиф.			
0M	0 M	0.67	2.37	2.37
10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-9</sup> M	32.52*	2.94	5.19*
10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-8</sup> M	47.07*	14.70*	14.83*
10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	деградация ДНК	28.33*	деградация ДНК
FeTButPyP(4)				
0M		1.33	0.87	0.87
10 <sup>-7</sup> M		1.43	3.28*	5.35*
10 <sup>-6</sup> M		1.62	4.02*	21.83*
10 <sup>-5</sup> M		2.51*	15.49*	деградация ДНК
CoTOEPyP(4)				
0 M		0.98	1.08	1.08
10 <sup>-7</sup> M		1.44	1.41	7.13*
10 <sup>-6</sup> M		1.54	1.44	8.19*
10 <sup>-5</sup> M		1.59*	18.49*	деградация ДНК

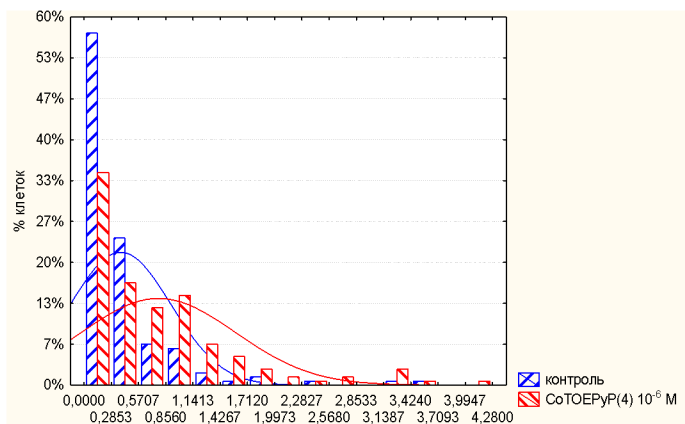
\* $p < 0.05$  - достоверная разница с контролем.

**Распределение по клеткам повреждений ДНК, индуцированных порфиринами.** Индуцированные генотоксикантами повреждения ДНК могут распределяться неравномерно не только по геному, но и по клеткам. Эффект действия лекарственных препаратов определяется не только средним уровнем индуцированных повреждений ДНК, но и реакцией небольших субпопуляций экспонированных клеток. Даже небольшая фракция клеток, будучи поврежденной при действии генотоксиканта, может дать начало патологическому процессу или опухоли. Небольшая субпопуляция опухолевых клеток, устойчивая к терапии, может стать причиной рецидива.

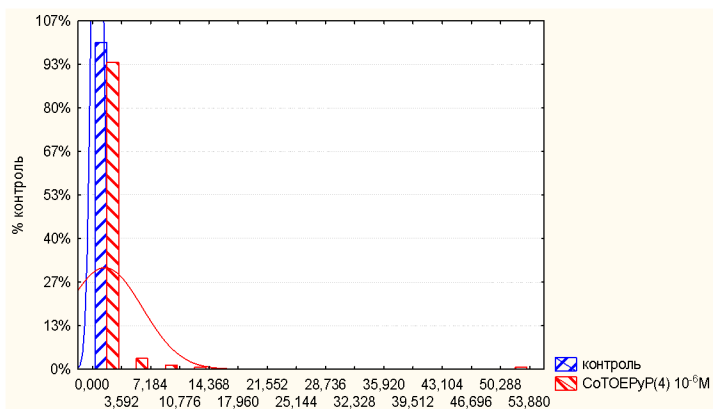
Метод ДНК-комет позволяет измерять повреждения ДНК в отдельных клетках и оценивать степень гетерогенности клеточного ответа на действие генотоксикантов. Момент хвоста Оливе (ОТМ) считается показателем

повреждений ДНК, наиболее адекватно отражающим гетерогенность клеточного ответа [Olive and Banáth, 2005].

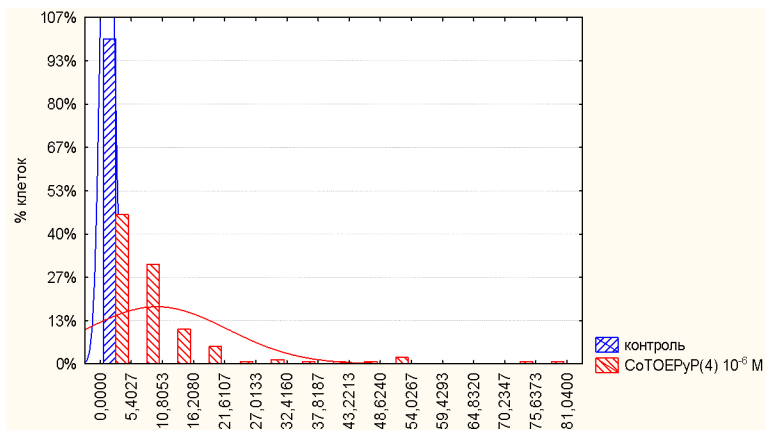
Нами были построены распределения, отражающие частоту комет с определенным ОТМ, индуцированных при обработке лейкоцитов человека TButРyP(4), FeTButРyP(4) и CoTOEPyP(4). Типичные примеры распределений, полученных при обработке CoTOEPyP(4) в концентрации  $10^{-6}$  М в стандартной, модифицированной клеточной и неклеточной версиях метода ДНК-комет, представлены на рис. 6, 7 и 8.



**Рис. 6.** Распределение комет по степени поврежденности ДНК (ОТМ) в лейкоцитах человека в контроле и после обработки интактных клеток в суспензии CoTOEPyP(4) ( $10^{-6}$  М).



**Рис. 7.** Распределение комет по степени поврежденности ДНК (ОТМ) в лейкоцитах человека в контроле и после обработки заключенных в агарозу интактных клеток CoTOEPyP(4) ( $10^{-6}$  М).



**Рис. 8.** Распределение комет по степени поврежденности ДНК (ОТМ) в лейкоцитах человека в контроле и после обработки нуклеоидов CoTOEPyP(4) ( $10^{-6}$  M).

Полученные зависимости позволили проследить за динамикой изменения поврежденности ДНК в клетках, обработанных порфиринами. В *стандартной версии метода ДНК-комет* в контроле 92% клеток имеют ОТМ<1, 6% клеток – ОТМ 1-2 и 2% клеток – ОТМ 2-5. После обработки порфирином *интактных клеток в суспензии* доля клеток с ОТМ<1 снизилась до 72%, доля клеток с ОТМ 1-2 повысилась до 20.6% и появилась фракция клеток (7.3%) с ОТМ 2-5 (рис. 6). В *модифицированной клеточной версии* в контроле 80% клеток имеют ОТМ<1, 14.6% клеток - ОТМ 1-2 и 5.3% клеток – ОТМ 2-4. Обработка порфирином *интактных клеток, заключенных в агарозу*, приводит к снижению доли клеток с ОТМ<1 до 63.3%, к повышению доли клеток с ОТМ 1-2 и 2-4 до 24% и 8.6%, соответственно, и к появлению 4% клеток с ОТМ 4-53 (рис. 7). В *модифицированной неклеточной версии* в контроле 50% клеток имеют ОТМ<1, 30.6% клеток – ОТМ 1-2 и 19.3% клеток – ОТМ 2-5. После обработки порфирином *нуклеоидов* количество клеток с ОТМ<1 и ОТМ 1-2 снижается, соответственно, до 1.3% и 5.3%, доля клеток с ОТМ 2-5 повышается до 37.3% и появляется 56.1% клеток с ОТМ 5-80 (рис. 8). При действии TButPyP(4) и FeTButPyP(4) наблюдается та же динамика изменения поврежденности ДНК - доля клеток с более высокими уровнями повреждений ДНК повышается с увеличением концентрации порфиринов и при переходе от обработки порфиринами интактных клеток в суспензии и в агарозе к обработке ДНК нуклеоида в неклеточной модели.

Таким образом, методом ДНК-комет показана зависимость распределения индуцированных порфиринами повреждений ДНК по клеткам от тестируемой модели (интактные клетки в суспензии, интактные клетки в агарозе и нуклеоид), а также от концентрации и структуры порфиринов.

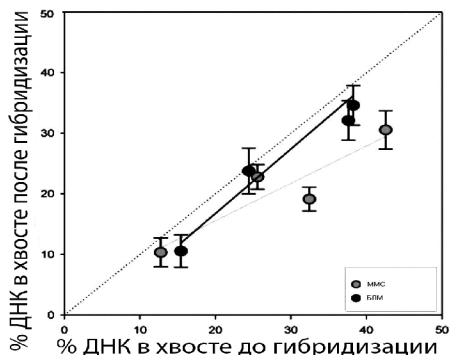
### 3.4. Разработка техники сочетания метода ДНК-комет с теломерными PNA пробам и оценка ее чувствительности в оценке повреждений ДНК и теломер.

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) – техника молекулярно-цитогенетического анализа, позволяющая визуально идентифицировать специфические последовательности ДНК в интерфазных клетках и на метафазных хромосомах. Техника основана на применении меченых ДНК-проб, которые будучи комплементарными определенным участкам генома, гибридизируются с ними и, таким образом, визуализируются на флуоресцентном микроскопе. Разработка PNA проб – синтетических ДНК/РНК аналогов, в которых сахаро-фосфатный остов заменен на нейтральный пептид/полиамидный с сохранением характерных для ДНК расстояний между азотистыми основаниями, позволила существенно повысить эффективность FISH-анализа [Volpi and Bridger, 2008]. Нейтральный пептидный остов придает PNA пробам устойчивость к деградации ДНК-азами и РНК-азами и обуславливает их стабильность в живых клетках. PNA пробы исключительно специфичны и чувствительны – эффективность их гибридизации на метафазных хромосомах составляет 99-100%. Одной из проблем гибридизации является доставка ДНК-проб к ДНК, в том числе их прохождение через клеточные мембраны. Небольшой размер теломерных PNA проб (15 пар оснований) позволяет им легко проникать в клетку.

Техника FISH с теломерными PNA пробам впервые была применена для измерения длины теломер метафазных [Landsorp et al., 1996], а затем интерфазных хромосом [de Pauw et al., 1998]. В нашей работе теломерные PNA пробы были впервые гибридизованы на препаратах комет для локализации повреждений ДНК в теломерных последовательностях.

**Сравнительная оценка повреждений ДНК до и после гибридизации с теломерными PNA пробам.** Влияние процедуры гибридизации на оценку уровня повреждений ДНК оценивали на основе анализа отдельных комет до и после гибридизации. Рис. 9 демонстрирует данные анализа 60 комет в контроле и при обработке клеток БЛМ (12.5, 25 и 100 МЕ/мл) и ММС (25, 50 и 100 мкг/мл). Обнаружено снижение % ДНК в хвосте после процедуры гибридизации в среднем на  $19.8 \pm 12.6$  %, при этом потери ДНК в сильно поврежденных клетках были выше, чем в клетках с низким уровнем повреждений.

Влияние процедуры гибридизации на уровень флуоресценции комет обусловлено разными причинами. Во-первых, небольшие фрагменты ДНК могут теряться в геле в результате диффузии, в особенности в хвостовой части кометы, и приводить к недооценке уровня повреждений. Во-вторых, после процедуры денатурации часть ДНК не успевает ренатурироваться и остается в одонитевом состоянии. Для окраски ДНК применяются красители-интеркаляторы (в наших экспериментах SYBR-green), которые специфичны только для двуцепочечной ДНК и не могут связываться с одонитевыми участками. Однако, несмотря на изменения абсолютного уровня интенсивности флуоресценции комет после гибридизации, зависимость доза-эффект сохраняет свою специфику.



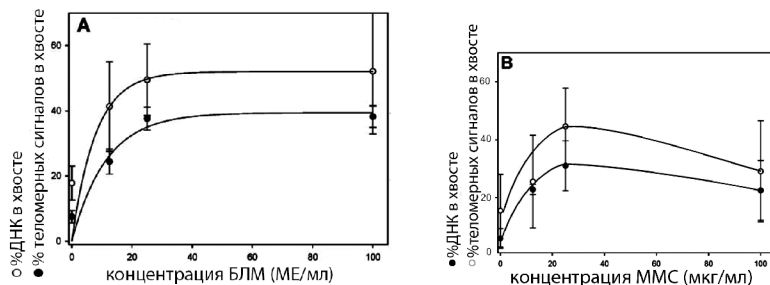
**Рис. 9.** Сравнение уровней повреждений ДНК до и после гибридизации. Гибридизация приводит к снижению детектируемого уровня повреждений ДНК по сравнению с теоретически ожидаемым, отмеченным на графике пунктирной линией.

### 3.5. Локализация мишеней генотоксических эффектов с применением сочетания метода ДНК-комет с техникой FISH

Интерес к индуцированным цитостатиками повреждениям теломерных и субтеломерных участков в нормальных и трансформированных клетках обусловлен разными причинами. Известно, что около теломер локализовано множество онкогенов [Lima-de-Faria et al., 1991; Lima-de-Faria and Mitelman 1988]. В *нормальных клетках* генетическая нестабильность, ассоциированная с дисфункцией теломер, рассматривается как раннее событие онкогенеза [Artandi et al., 2000]. Теломеразная активность, препятствующая укорочению теломер, обнаружена в большинстве *опухолевых клеток* и ассоциируется с их бессмертием. Блокирование теломер и теломеразы является одной из терапевтических стратегий [Ishibashi and Lippard, 1998; Johnston et al., 2003].

С целью локализации мишеней мутагенного действия цитостатиков ММС, БЛМ и *цис*-ДДП в геноме нормальных и трансформированных клеток был применен метод ДНК-комет в сочетании с флуоресцентной *in situ* гибридизацией с теломерными РНА пробами. Повреждения теломер оценивали путем локализации теломерных сигналов в "голове" или в "хвосте" кометы. Наличие флуоресцентных сигналов в "хвосте" кометы рассматривали в качестве критерия повреждения теломер. Преимуществом применения ДНК-проб непосредственно на препаратах комет является возможность сопоставления уровней повреждений всей ДНК и определенных локусов генома в одних и тех же клетках.

**Повреждения теломер, индуцированные ММС и БЛМ в лейкоцитах человека.** Уровни повреждений теломер (процентное содержание теломерных сигналов в хвосте комет), индуцированных БЛМ и ММС в лейкоцитах периферической крови человека, представлены на рис. 10.



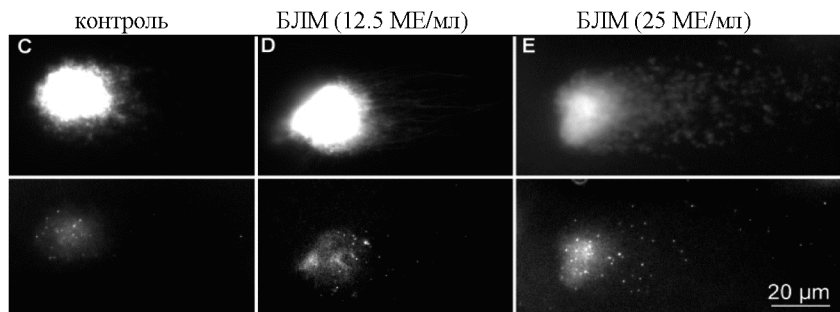
**Рис. 10.** Уровни повреждений ДНК и теломер после обработки БЛМ (А) и ММС (В) лейкоцитов человека. Процент теломерных сигналов в хвосте при действии БЛМ и ММС превышает процент ДНК в хвосте и меняется в зависимости от дозы в соответствии с изменением % ДНК в хвосте.

В контрольных вариантах кометы содержат до 17.8 % теломерных сигналов в хвосте. На рис. 10 А показана динамика уровней повреждений ДНК и теломер в лейкоцитах, обработанных БЛМ. Линейное дозо-зависимое повышение уровня повреждений вплоть до концентрации 25 МЕ/мл характерно как для всей ДНК, так и для теломерных участков. При повышении дозы БЛМ до 100 МЕ/мл уровень повреждений как ДНК, так и теломер изменяется незначительно. ММС в концентрациях 25 и 50 мкг/мл вызывает повышение, а начиная с 50 мкг/мл - снижение % ДНК и теломер в хвосте в результате формирования сшивок ДНК (рис. 10 В).

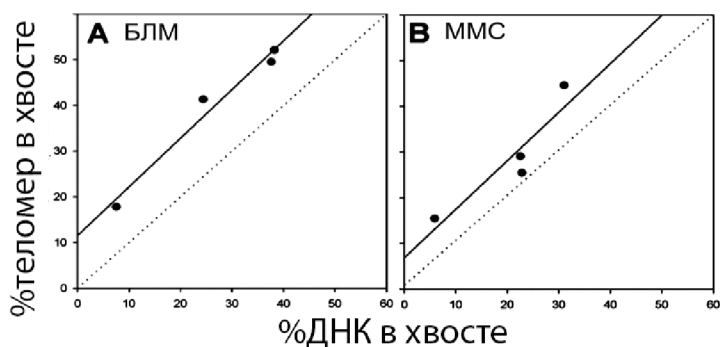
Типичные изображения комет с повышенным уровнем содержания ДНК и теломер в хвосте представлены на рис. 11 (С-Е). Количество теломерных сигналов превышает количество ДНК в хвосте комет во всех вариантах, обработанных как БЛМ, так и ММС, однако тенденция изменения обоих параметров одинакова. *Корреляция между средним процентным содержанием теломер и ДНК* в хвосте комет показана на рис. 12. При обработке как БЛМ (рис. 12А), так и ММС (рис. 12В) наблюдается линейная зависимость между процентным содержанием теломер и ДНК в хвосте с коэффициентом регрессии  $b=1.07$  для БЛМ и  $b=1.03$  для ММС. Эти значения незначительно отличаются от  $b=1.0$ , ожидаемого при случайном распределении повреждений ДНК по геному.

Таким образом, применение специфических для теломерных последовательностей PNA проб позволило получить небольшие, но отчетливые сигналы теломерных (TTAGGG) $_n$  повторов в голове и хвосте комет. Различия в уровнях повреждений теломер и в распределении теломерных сигналов в голове и хвосте комет, индуцированных БЛМ и ММС, отражают разные молекулярные механизмы действия мутагенов на ДНК. БЛМ вызывает разрывы ДНК [Anderson et al., 1997] и последующую миграцию ДНК и теломер при кометном электрофорезе. ММС индуцирует в основном межнитевые сшивки ДНК-ДНК [Yang and Wang, 1999], задерживая тем самым миграцию ДНК и теломер в хвост кометы, но в определенных концентрациях приводит к формированию разрывов ДНК за счет образования перекиси водорода [Pffuhler and Wolf, 1996].

Соотношения уровней повреждений теломер и ДНК при действии ММС и БЛМ отличаются незначительно, следовательно распределение индуцированных ММС и БЛМ повреждений в ДНК в целом и в теломерах является случайным. Случайный характер распределения индуцируемых ММС и БЛМ повреждений может быть обусловлен диффузным характером распределения мутагенов внутри ядра. Преобладающее содержание теломер (17%) по сравнению с ДНК (7%) в хвосте комет в контрольных вариантах может быть обусловлено локализацией теломер на периферии ядра [Santos et al., 1997].



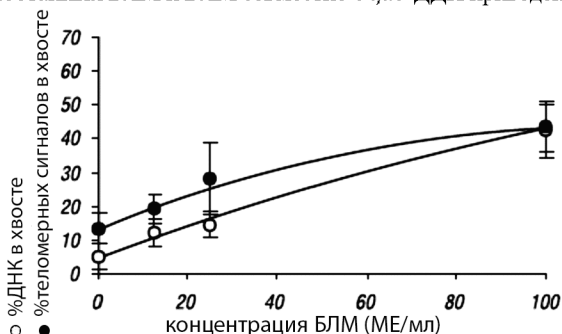
**Рис. 11.** Изображения комет после обработки БЛМ (С-Е) в концентрациях 0 (С), 12.5 (D) и 25 МЕ/мл (Е). ДНК окрашена Sybr Green, теломеры окрашены Cy3.



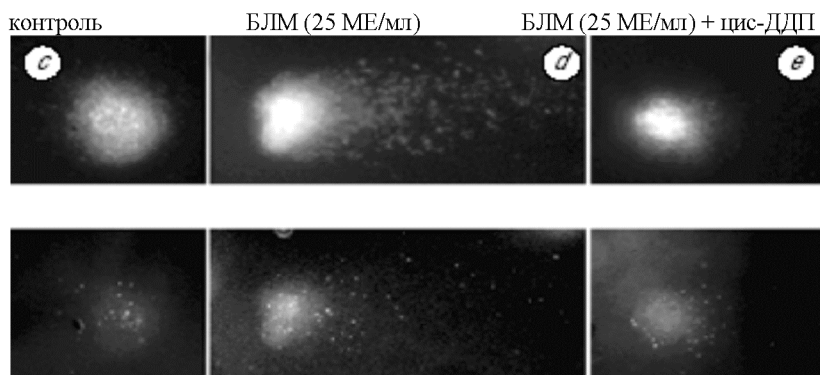
**Рис. 12.** Корреляция между количеством теломерных сигналов и ДНК в хвосте комет в лейкоцитах человека на основе контрольных данных и результатов обработки тремя концентрациями БЛМ (А) и ММС (В). Сплошная прямая линия получена в результате линейного регрессионного анализа средних значений. Коэффициенты регрессии достоверно не отличаются от 1. Сдвиг сплошной линии в сторону от пунктирной (показывающей ожидаемое соотношение) свидетельствует о независимом от мутагена повышенной фрагильности участков ДНК, ассоциированных с теломерными повторами.



**Повреждения теломер, индуцированные *цис*-ДДП и БЛМ в лейкоцитах человека.** Уровни *повреждений теломер* в лейкоцитах человека, обработанных БЛМ и *цис*-ДДП совместно, представлены на рис. 13. При совместном действии *цис*-ДДП ( $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) с БЛМ в концентрациях 12.5 и 25 МЕ/мл количество теломерных сигналов в хвосте кометы уменьшается примерно вдвое, а в концентрации 100 МЕ/мл - от  $52.1 \pm 2.7$  до  $43.8 \pm 1.6\%$  по сравнению с обработкой только БЛМ. Изображения комет с теломерными сигналами в лейкоцитах, обработанных БЛМ и БЛМ совместно с *цис*-ДДП приведены на рис. 14.



**Рис. 13.** Эффект совместного действия *цис*-ДДП и БЛМ на уровень повреждений всей ДНК и теломер в лейкоцитах человека.

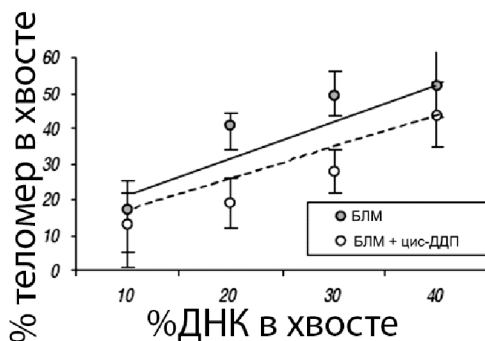


**Рис. 14.** (с-е) Изображения комет до после гибридизации лейкоцитов человека с теломерными РНА пробами. с) клетки в контроле, (d) клетки, обработанные БЛМ (25 МЕ/мл) и (e) клетки, обработанные БЛМ (25 МЕ/мл)+*цис*-ДДП ( $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ).

Сравнение уровней повреждений ДНК и теломер при обработке БЛМ и БЛМ совместно с *цис*-ДДП показывает, что количество теломер превышает количество ДНК в хвосте во всех экспериментальных вариантах. В клетках, обработанных

только *цис*-ДДП % ДНК в хвосте снизился от 7.5 до 4.8, а % теломер в хвосте - от 17.8 до 13.5 по сравнению с контрольным уровнем. При совместной обработке БЛМ и *цис*-ДДП уровень миграции всей ДНК и теломерных участков в хвост комет по сравнению с действием БЛМ снижается в зависимости от дозы. Наиболее сильный эффект проявляется при действии низкой дозы БЛМ (12.5 МЕ/мл), при этом %ДНК в хвосте снижается от 24.4 до 12.1, а % теломерных сигналов в хвосте – от 41.1 до 19.2.

Коэффициент линейной регрессии, отражающий взаимосвязь между уровнями повреждений ДНК и теломер при обработке клеток БЛМ равен 1 ( $b=1.07$ ), а при совместной обработке БЛМ с *цис*-ДДП меньше 1 ( $b=0.77$ ) (рис. 15). Таким образом, в клетках, обработанных только БЛМ, теломеры мигрируют в "хвост" с той же вероятностью, что и вся ДНК, следовательно *БЛМ-индуцированные разрывы равномерно распределены* по всей ДНК, включая теломерные повторы. При совместном действии *цис*-ДДП с БЛМ задержка индуцированной БЛМ миграции теломер преобладает над задержкой миграции всей ДНК. Следовательно, *цис*-ДДП образует сшивки преимущественно в теломерных участках.



**Рис. 15.** Сравнение уровней повреждений всей ДНК и теломерных участков в лейкоцитах человека, обработанных БЛМ и *цис*-ДДП с БЛМ.

Преобладание количества теломерных сигналы в хвостах комет над количеством ДНК может быть обусловлено как высокой хрупкостью теломерных участков, так и периферической локализацией теломер в ядре [Santos et al., 1997], позволяющей им с большей вероятностью мигрировать в хвост кометы. Другое объяснение может заключаться в том, что концевые фрагменты хромосом, содержащие теломеры, образуются в результате одного разрыва, а внутрихромосомные фрагменты – в результате двух разрывов.

*Цис*-ДДП-индуцированные сшивки ДНК в методе комет выявляются преимущественно при действии низких концентраций БЛМ. При действии высоких концентраций БЛМ в формировании комет могут вносить свой вклад цитотоксические эффекты. Помимо этого, большое количество разрывов ДНК приводит к формированию множества фрагментов, диффундирующих из геля во время лизиса и электрофореза, а небольшие фрагменты ДНК трудно

визуализируются. Поэтому регистрация незначительного количества спивок на фоне значительного количества разрывов ДНК представляется затруднительной [Сорочинская, Михайленко, 2008].

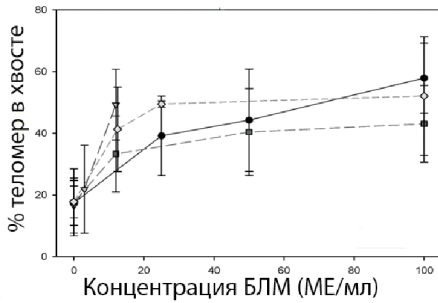
Большинство из *цис*-ДДП-индуцированных спивок (60-65%) - внутринитевые спивки между прилегающими гуанинами (сайты GrG) в позиции 7N, остальные 20-25% - внутринитевые ApG спивки [Bradley et al., 1993; Kelland, 2007]. Вызванная *цис*-ДДП задержка миграции ДНК при электрофорезе в методе комет обусловлена укрупнением размеров фрагментов в сайтах потенциальных разрывов [Merk and Speit, 1999]. Повышенная активность образования спивок в теломерах обусловлена тем, что теломерные повторы на 50% состоят из гуанина и, таким образом, являются селективной мишенью действия *цис*-ДДП. Способность *цис*-ДДП снижать активность теломеразы в опухолевых клетках семенников человека [Burger et al., 1997] также объясняют тем, что теломерные повторы, РНК компонент теломеразы, а также кодирующий ее ген обогащены гуанином. Соединения, избирательно связывающиеся с теломерными повторами TTAGGG и способные таким образом их дестабилизировать, рассматриваются как потенциальные противоопухолевые препараты [Suh et al., 2002].

Таким образом, применение теломерных PNA проб на кометах позволило локализовать БЛМ-индуцированные разрывы и *цис*-ДДП-индуцированные спивки ДНК в лейкоцитах человека. Результаты свидетельствуют об информативности этого подхода для идентификации мишеней действия цитостатиков, в том числе, при их комбинированном применении.

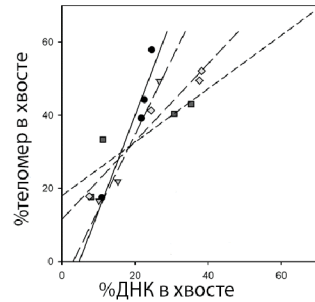
**Повреждения теломер, индуцированные БЛМ в клеточных линиях HT1080, CCRF-CEM и СНО.** Действие БЛМ на теломеры оценивали в трансформированных клетках фиброкарциномы человека HT1080, лейкемических Т-клетках человека CCRF-CEM и эпителиальных клетках яичников китайского хомячка СНО. Клетки HT1080 и CCRF-CEM были выбраны для сравнения их чувствительности с нормальными клетками человека, а клетки СНО - в связи с наличием внутрихромосомных теломерных повторов [Meune et al., 1990] и низким уровнем репарации [Thompson et al., 1980].

Уровни повреждений теломер при действии БЛМ (25, 50 и 100 МЕ/мл) в трансформированных клеточных линиях и нормальных лейкоцитах человека представлены на рис. 16. Теломеры клеток СНО оказались наиболее чувствительными, а теломеры клеток HT1080 - наиболее устойчивыми к действию БЛМ. Отчетливое дозо-зависимое повышение количества теломерных сигналов в хвосте характерно для клеток СНО. Зависимое от дозы повышение количества теломерных сигналов в хвосте комет наиболее выражено в клетках CCRF-CEM и нормальных лейкоцитах и, в меньшей степени, в клетках HT1080.

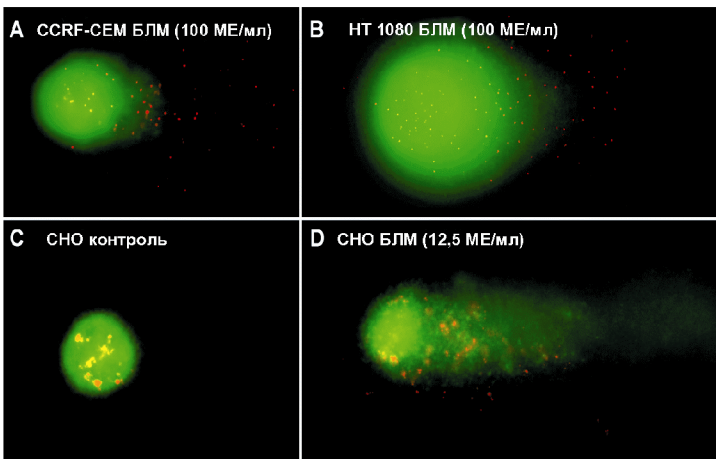
*Соотношение между количеством ДНК и теломерных сигналов* в хвосте при обработке клеток БЛМ различно для разных клеток (рис. 17). *Коэффициент линейной регрессии*, отражающий взаимосвязь между уровнями повреждений ДНК и теломер, составляет 2.62 в клетках CCRF-CEM, 2.06 - в клетках СНО, 0.73 - в клетках HT1080 и 1.06 - в нормальных лейкоцитах. В разных клеточных линиях после воздействия БЛМ теломерные сигналы имеют разные размеры и распределены в голове и хвосте комет в различном соотношении (рис. 18).



**Рис. 16.** Процент теломерных сигналов в хвосте комет в клеточных линиях CCRF-CEM (-●-), HT1080 (-■-), CHO (-△-) и в нормальных лейкоцитах человека (-◇-), обработанных БЛМ.



**Рис. 17.** Результаты линейного регрессионного анализа корреляции между процентным содержанием теломерных сигналов и ДНК в хвосте комет после действия БЛМ в клеточных линиях и нормальных лейкоцитах человека. Коэффициент регрессии больше 1 в клетках CCRF-CEM (-●-) и CHO, меньше 1 в HT1080 (-■-) и близок к 1 в нормальных лейкоцитах человека (-◇-).



**Рис. 18.** Изображения комет с теломерными сигналами в клеточных линиях CCRF-CEM, HT1080 и CHO, полученные с применением теломерных PNA проб для окраски теломерных участков и SYBR-green для окраски всей ДНК.

Особенно крупные сигналы обнаружены в клетках CHO. Множество небольших отчетливых сигналов обнаружено в клетках CCRF-CEM и HT1080.

Полученные данные свидетельствуют о разной чувствительности ДНК и теломер клеточных линий HT1080, CCRF-CEM, CHO и нормальных лейкоцитов человека к действию БЛМ.

Теломеры в эпителиальных клетках китайского хомячка CHO значительно чувствительнее к действию БЛМ, чем вся ДНК. Для внутривнутрихромосомных теломерных участков клеток CHO характерна повышенная фрагильность [Meune et al., 1990; Bolzan et al., 2001]. Гетерохроматиновые теломерные блоки склонны к разрывам и являются горячими точками повреждений ДНК [Balajee et al., 1996; Ruiz-Neirera et al., 2009], однако данные о фрагильности внутривнутрихромосомных теломерных повторов противоречивы. При анализе хромосомных нарушений с применением теломерных PNA проб показано, что теломерные повторы в клеточных линиях Chinese hamster ovary (CHO) и Chinese hamster embryo (CHE) наиболее часто вовлекаются в разрывы хромосом и рекомбинации и являются чувствительной мишенью для действия БЛМ и стрептонигрина [Bolzan et al., 2001]. Внутривнутрихромосомные теломерные повторы CHO вовлечены в образование хромосомных и хроматидных разрывов, индуцированных БЛМ с частотой превышающей ожидаемую (рассчитанной на основе доли генома, включающей теломерные повторы) [Sánchez et al., 2009]. Таким образом наши результаты, полученные с применением PNA FISH на кометах в клетках CHO, согласуются с литературными данными.

Теломеры клеток CCRF-CEM также чувствительнее к действию БЛМ, чем ДНК в целом, возможно они являются локусами геномной нестабильности данной клеточной линии. При этом в исследованиях с применением теломерных PNA проб на метафазных хромосомах в клетках CCRF-CEM [Wick and Gebhart, 2005 a,b] и в нормальных лимфоцитах человека [Wick and Gebhart, 2005 b,c], обработанных БЛМ и ММС, не обнаружены значимые изменения длины теломер. Возможно высокий уровень активности теломеразы в клетках CCRF-CEM способствует восстановлению обнаруживаемых методом ДНК-комет повреждений теломер.

Теломеры клеток HT1080, в отличие от других клеточных линий, менее чувствительны к БЛМ, чем ДНК в целом.

Полученные данные свидетельствуют о различиях чувствительности разных клеточных линий к мутагенам и характера распределения повреждений по геному. Различная чувствительность трансформированных клеток может быть обусловлена характерными для них множественными структурными и количественными генетическими аномалиями. Применение FISH на препаратах комет позволило оценить чувствительность теломерных участков в качестве потенциальных мишеней действия цитостатиков. Результаты анализа повреждений ДНК и теломер при действии цитостатиков на опухолевые клетки подтверждают информативность этого подхода для оценки чувствительности трансформированных клеток к лекарственным препаратам.

## ВЫВОДЫ

Проведенное исследование локализации повреждений ДНК и хромосом в геноме и их распределений по клеткам при действии ряда биологически активных соединений (лекарственных препаратов и пищевых компонентов) позволяет сформулировать следующие выводы:

1. Разработанная система оценки генотоксических и генопротекторных свойств пищевых компонентов на основе использования микроядерного теста с блокированием цитокинеза в клетках карциномы кишечника человека HT29 позволила выявить генопротекторные свойства бутирата (продукта ферментативной переработки пищевых волокон кишечными бактериями) при индукции повреждений хромосом Fe-НТА и перекисью водорода.
2. Применение комплекса микроядерного теста и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) позволило выявить неравномерное распределение по хромосомам повреждений, индуцированных ММС в лейкоцитах человека: наиболее часто повреждаются хромосомы 9, 16 и X-хромосома у женщин. Не обнаружена корреляция между включением хромосом в микроядра и их локализацией в ядре, а также с длиной и плотностью генов. Включение хромосом в ММС-индуцированные микроядра обусловлено способностью ММС повреждать перичентромерные гетерохроматиновые участки 9-й и 16-й хромосом. Достоверное различие между частотами микроядер с X-хромосомой в мужских (0.99%) и женских (4.25%) клетках подтверждает гипотезу о преимущественном повреждении инактивной гетерохроматизированной женской X-хромосомы.
3. Поэтапное применение центромерных и цельнохромосомных ДНК-проб в микроядерном тесте позволило впервые идентифицировать мишени действия мутагенов на хромосомах, а также различить кластогенные и анеугенные эффекты, что может применяться для оценки специфичности действия различных мутагенных факторов.
4. Выявлены достоверные различия в чувствительности нормальных лейкоцитов человека и трансформированных клеток различного тканевого происхождения к широко применяемому и потенциальным противоопухолевым соединениям, что позволяет рекомендовать метод ДНК-комет для оценки побочных эффектов лекарств, а также выбора препаратов с оптимальным терапевтическим эффектом, в том числе при их комбинированном применении.
5. Установлено, что порфирины вызывают повреждения ДНК в клеточной и неклеточной моделях, индуцируя в нуклеоиде достоверное повышение уровня разрывов ДНК по сравнению с интактными клетками. Предполагается прямое воздействие порфиринов на ДНК интактных клеток с формированием разрывов в участках их интеркаляции или внешнего связывания с ДНК.

6. Выявлены различия в распределении повреждений ДНК по клеткам в зависимости от структуры и концентрации порфиринов, что позволяет рекомендовать данную тест-систему в качестве чувствительного биомаркера генотоксических эффектов.
7. Разработан метод гибридизации теломерных PNA проб на препаратах комет для одновременной оценки уровня повреждений геномной ДНК и теломерных участков, что впервые позволило оценить характер распределения индуцированных повреждений по геному и в теломерах:
  - a. в нормальных лейкоцитах человека повреждения ДНК, индуцированные ММС и БЛМ, распределяются по геному равномерно;
  - b. обработка нормальных лейкоцитов человека *цис*-ДДП приводит к образованию спивок ДНК преимущественно в теломерных участках;
  - c. в трансформированных клетках ССRF-СЕМ и СНО при действии БЛМ теломеры повреждаются чаще, а в клеточной линии НТ1080 - реже, чем вся ДНК; сравнительно высокий уровень повреждений теломер в клетках СНО подтверждает феномен фрагильности внутрихромосомных теломерных последовательностей, характерных для данной клеточной линии.
8. Метод ДНК-комет с применением теломерных PNA проб позволил идентифицировать мутагены, избирательно повреждающие теломерные участки хромосом и рекомендуется для оценки специфики действия мутагенов и чувствительности нормальных и трансформированных клеток к лекарственным препаратам.
9. С целью локализации повреждений в геноме разработаны подходы к применению центромерных, цельнохромосомных и локус-специфичных проб на препаратах микроядер и комет и показано, что комплексные подходы существенно повышают чувствительность стандартных методов оценки мутагенных факторов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Оганесян Г.Г.** Метод ДНК-комет в оценке повреждений и репарации ДНК 1. Оценка эндогенных повреждений ДНК. Ученые записки ЕГУ. 2003; 1: 151-154.
2. **Оганесян Г.Г.** Метод ДНК-комет в оценке повреждений и репарации ДНК 2. Спонтанные и УФ-индуцированных повреждения ДНК в группах генетического риска. Ученые записки ЕГУ. 2003; 3: 146-149.
3. Arutyunyan R.M., Gebhart E., **Hovhannisyan G.G.**, Greulich K.O., Rapp A. Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in the DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage. *Mutagenesis*. 2004; 19(1): 403-408.

4. **Hovhannisyan G.G.**, Haroutunyan T.S., Arutyunyan R.M. Evaluation of cisplatin-DNA crosslinks formation with UV-C application by the alkaline comet-assay. *Exp Oncol.* 2004; 26(3): 240-242.
5. Arutyunyan R.M., Gebhart E., **Hovhannisyan G.G.**, Greulich K.O., Rapp A. Application of the Comet-FISH technique for the detection of telomeric repeats in DNA damaged by Bleomycin and Mitomycin C. Poster, 21 GUM meeting abstracts, Wurzburg, 2004, p. 34.
6. Arutyunyan R., Gebhart E., **Hovhannisyan G.**, Greulich K.O., Rapp A. Application of the Comet-FISH technique for the localization of telomers in damaged DNA, induced in human cells by Bleomycin and Mitomycin C. *International Journal of molecular medicine*, 14 (Suppl. 1), 2004. Proceedings of Abstracts of the 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine, Hersonissos, Crete, Greece. 14-16 October, 2004, p. 109.
7. **Hovhannisyan G.G.**, Rapp A., Arutyunyan R.M., Greulich K.O., Gebhart E. Comet-assay in combination with PNA-FISH detects mutagen-induced DNA damage and specific repeat sequences in the damaged DNA of transformed cells. *International Journal of Molecular Medicine.* 2005; 15:437-442.
8. Arutyunyan R.M., Rapp A., Greulich K.O., **Hovhannisyan G.**, Haroutiumian S., Gebhart E. Fragility of telomeres after bleomycin and cisplatin combined treatment measured in human leukocytes with the Comet-FISH technique. *Exp Oncol.* 2005; 27(1):38-42.
9. **Hovhannisyan G.**, Haroutiumian S., Margaryan K., Ghazaryan R., Aroutiounian R. DNA Damage Induced by New Pophyrins of Different Chemical Structure. *Korean J. Environ. Biol.* 2005; 23(4): 379-382.
10. Aroutiounian R.M., **Hovhannisyan G.G.**, Gebhart E., Rapp A., Greulich K.O. Application of molecular recognition approach by Comet-FISH-assay. *International Symposium on Hydration and Thermodynamics of Molecular Recognition.* Tsakhkadzor, Armenia. 1-5 March, 2005, p. 12.
11. Gebhart E., **Hovhannisyan G.**, Greulich K.O., Rapp A., Arutyunyan R. Detection of telomeric repeats using the single cell gel electrophoresis-FISH technique in DNA damaged by cytostatics. *Meeting of Deutsche Gesellschaft für Humangenetik.* N 1, Marz, 2005. 17, P002, p 58.
12. **Hovhannisyan G.G.** Investigation of DNA damage and telomere fragility by comet-FISH technique in different cell lines. The Second International Conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”, dedicated to N.W.Timofeeff-Ressovsky and the 70th anniversary of “On the Nature of Gene Mutations and Gene Structure” by N.W. Timofeeff-Ressovsky, K.G. Zimmer, and M. Delbrück. Yerevan, 8-11 September, 2005, p. 64.
13. **Hovhannisyan G.**, Gasparyan G., Haroutiumian S., Dalyan Ye. Margaryan K., Aroutiounian R. Comparative investigation of genotoxic activity of new porphyrin on the levels of purified DNA, cell and acellular experimental systems. The Second International Conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” dedicated to N.W.Timofeeff-Ressovsky and the 70th anniversary of “On the Nature of



- Gene Mutations and Gene Structure” by N.W. Timofeeff-Ressovsky, K. G. Zimmer, and M. Delbrück. Yerevan, 8-11 September, 2005, p. 66.
14. Arutyunyan R., **Hovhannisyan G.**, Gasparyan G., Dalyan Ye., Margaryan K., Ghazaryan R., Haroutiunian S. Effects of new porphyrins evaluated at the levels of purified DNA, cell and acellular experimental systems. International alumni seminar on “Biotechnology and Health”, Erevan, 18-21 October, 2005, p. 21-26.
  15. Арутюнян Р.М., **Оганесян Г.Г.**, Маргарян К.С., Мурадян Р.Е. Сравнительный анализ генотоксических эффектов новых порфиринов методом ДНК-комет *in vivo*. Ученые записки ЕГУ. 2007; 1(212):153-155.
  16. Aroutiounian R., **Hovhannisyan G.**, Gasparyan G. Genetic effects of electromagnetic waves. Brilliant Light in Life and Material Sciences, Springer. 2007, 251-265.
  17. Gasparyan G., **Hovhannisyan G.**, Ghazaryan R., Sahakyan L., Tovmasyan A., Grigoryan R., Sarkissyan N., Haroutiunian S., Aroutiounian R. In vitro testing of cyto- and genotoxicity of new porphyrin water-soluble metal derivatives. Int J Toxicol. 2007 Nov-Dec; 26(6):497-502.
  18. Арутюнян Р.М., **Оганесян Г.Г.**, Мурадян Р.Е., Гаспарян Г.Г. Генетическая токсикология: перспективы *in vitro-in vivo*. Международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО «Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики» (к 100-летию Н.М. Сисакяна) Ереван-Аптарак, 2-4 апреля, 2007, с. 15.
  19. Arutyunyan R., Gevorgyan R., **Hovhannisyan G.**, Gevorgyan A., Gasparyan G. Modification of natural zeolites and zeolite-like materials and their application as nanoporous microcarriers of pharmaceuticals (biologically active compounds) International expert meeting “Drug design and development”. Moscow, 10-11 December, 2007.
  20. Arutyunyan R., **Hovhannisyan G.**, Gasparyan G. Risk assessment of new chemical compounds in Armenia: geneticist’s point of view. Book of Abstracts of the International Conference “State-of-the-Art Biotechnology in Armenia and ISTC contribution”, Tsakhadzor, September 28 - October 02, 2008, p. 33.
  21. Arutyunyan R., **Hovhannisyan G.**, Gevorgyan A., Margaryan K., Muradyan R., Gasparyan G. Assessment of genotoxicity of potential pharmaceutical preparation: in vitro-in vivo approach International Conference “Biotechnology and Health”-2 and DAAD Alumni seminar, Yerevan, 21-25 April, 2008, p. 13-19.
  22. Aroutiounian R., **Hovhannisyan G.**, Gasparyan G. Genetic risk assessment of chemical compounds and pollutants. Abstr. of the 11th SAC Seminar “New Trends in Chemical Toxicology”, Moscow, September 22-25, 2008, p. 18.
  23. Tovmasyan A., Sahakyan L., Babayan N., Gasparyan G., Margaryan K., **Hovhannisyan G.**, Aroutiounian R., Ghazaryan R. Novel cationic porphyrins and metalloporphyrins as potential photosensitizers and chemotherapeutics. J. Porphyrins Phthalocyanines, International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines, Russia, 2008, p. 594.

24. **Hovhannisyan G.**, Mkrtchyan H., Liehr T., Aroutiounian R. Involvement of chromosomes 7, 18 and X in mitomycin C-induced micronuclei. *Balkan Journal of Medical Genetics (BJMG)*. 2008; 11(2):45-49.
25. Glej M., **Hovhannisyan G.**, Pool-Zobel B.L. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review *Mutation Research*. 2009; 681:33-43.
26. **Hovhannisyan G.**, Aroutiounian R., Glej M. Butyrate reduces the frequency of micronuclei in human colon carcinoma cells in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2009; 23:1028-1033.
27. **Оганесян Г.Г.** Методы и проблемы генетической токсикологии. *Ученые записки ЕГУ*. 2009; 2 :3-9.
28. **Оганесян Г.Г.**, Авагян А.Л., Тадевосян Г.Л., Арутюнян Р.М. Оценка индуцированных митомидином С повреждений X хромосомы в лейкоцитах человека методом MN-FISH. *Ученые записки ЕГУ*. 2009; 3:58-61.
29. Gasparyan G., Grigoryan R., Sarkissyan N., Babayan N.S., Pogosyan D.A., **Hovhannisyan G.**, Aroutiounian R. Alternative in vitro toxicology: the present and future in Armenia. *The New Armenian Medical Journal*. 2009; 3(2): 49-57.
30. Aroutiounian R., **Hovhannisyan G.**, Gasparyan G., Jin Kyu Kim Development of systems for genetic risk evaluation. *The Joint International Symposium of 5th International Conference of Toxicogenomics (ICT) & 2nd Toxicogenomics Integrated Environmental Science (TIES)*, Seoul, Korea, September 20-23, 2009, N 2, p. 94.
31. **Hovhannisyan GG.** Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Mol Cytogenet*. 2010, 3:17.
32. **Оганесян Г.Г.** FISH-анализ хромосомного состава индуцированных митомидином С микроядер *Биолог. журн. Армении*. 2011; 2 (63): 19-24
33. Арутюнян Р.М., **Оганесян Г.Г.** Анализ повреждений ДНК и хромосом методами молекулярной цитогенетики. *Вестник Российской АМН*. 2011; 9:57-63.
34. **Hovhannisyan G.**, Aroutiounian R., Liehr T., Chromosomal composition of micronuclei in human leukocytes exposed to mitomycin C. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012; 60(4): 316-322.
35. Babayan N.S., Gevorkyan A.L., Aroutiounian R.M., **Hovhannisyan G.G.** The Comet-FISH technique for monitoring cancer treatment response at the genomic level. *International Conference on Postgenomic Technology for Biomedicine*. Novosibirsk, Russia, June 25-29, 2012, p. 119.

**ՀՈՎՀԱՆՆԻՄՅԱՆ ԳԱԼԻՆԱ ԳԵՈՐԳԻԻ**  
**ԴՆԹ-Ի ԵՎ ՔՐՈՄՈՍՈՄՆԵՐԻ ՎՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ՏԵՂԱՅՆԱՑՈՒՄԸ**  
**ՄԱՐԴՈՒ ԲԶԻՋՆԵՐՈՒՄ**  
**ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ**

Մուտագեններով ինդուկցված վնասվածքները գենոմում բաշխվում են անհավասարաչափ: Կորման կետերի ոչ պատահական տեղակայումը քրոմոսոմների վրա պայմանավորված է կորիզում քրոմոսոմի կառուցվածքի ու դիրքի և քրոմոսոմային ԴՆԹ-ի առաջնային վնասվածքների միջև փոխազդեցությամբ՝ մուտագենով ազդելու պահին, ինչպես նաև կախված է գենոմի տարբեր լոկուսներում ռեպարացիայի ակտիվությունից:

Գենոմում վնասվածքների բաշխման ուսումնասիրման առաջընթացը պայմանավորված է նոր մոտեցումների մշակմամբ: Մոլեկուլային-գենետիկական տեխնոլոգիաները, որոնք հիմնված են ֆլյուորեսցենտ *in situ* հիբրիդացման (FISH) և ԴՆԹ-կոմետ ու միկրոկորիզային մեթոդների հետ համակցված կիրառման վրա, թույլ են տալիս միաժամանակ բացահայտել քրոմոսոմների և ԴՆԹ-ի վնասվածքները ու որոշել դրանց տեղայնացումը առանձին բջիջների գենոմում: Ատենախոսության շրջանակներում ուսումնասիրվել է մուտագենների ազդեցության թիրախների տեղայնացումը մարդու բջիջներում ԴՆԹ-կոմետ և միկրոկորիզային մեթոդների հետ FISH տեխնիկայի համակցված կիրառմամբ:

Քրոմոսոմների վնասվածքների վերլուծությունն իրականացվել է բջջակիներգի արգելակմամբ միկրոկորիզային թեստի կրառմամբ աղիքի բաղցկեղ առաջացնող երկաթի նիտրիլտեռացետատով (Fe-HTA) և ջրածնի պերօքսիդով ( $H_2O_2$ ), ինչպես նաև աղիքային բակտերիաներով սննդային թելիկների ֆերմենտային վերամշակման արգասիքով՝ բուտիրատով HT29 աղիքի աղենոմայի բջիջներում: Առաջին անգամ ցույց է տրված բուտիրատի գենապաշտպանական ակտիվությունը Fe-HTA և  $H_2O_2$ -ով ինդուկցված քրոմոսոմների վնասվածքների նկատմամբ:

Քրոմոսոմների վնասվածքների վերլուծությունն իրականացվել է FISH և միկրոկորիզային մեթոդների համակցված կիրառմամբ: Ուսումնասիրվել է միտոմիցին C-ով ինդուկցված քրոմոսոմների վնասվածքների տեղայնացումը մարդու լեյկոցիտներում միկրոկորիզների պատրաստուկների վրա FISH տեխնիկայի կիրառմամբ: Օգտագործվել են ցենտրոմերային և ամբողջական քրոմոսոմային գոտիներ:

Ցույց է տրված, որ միտոմիցին C-ով ինդուկցված միկրոկորիզներում առավել հաճախ հանդիպում են 9-րդ և 16-րդ քրոմոսոմները, ինչպես նաև X-քրոմոսոմը կանանց մոտ: Ուսումնասիրված քրոմոսոմների միկրոկորիզներում ընդգրկման և կորիզում դրանց տեղակայման, երկարության և գեների խտության միջև կորելյացիա չի հայտնաբերվել: Աշխատանքում քննարկվում է քրոմատինի կառուցվածքի դերը՝ որպես միտոմիցին C-ի նկատմամբ քրոմոսոմների զգայությունը որոշող հիմնական գործոն:

Իրականացվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների վերլուծություն՝ ԴՆԹ-կոմետ մեթոդով: Այն ի հայտ է բերել մարդու նորմալ էլեկոցիտների, ֆիբրոսարկոմայի տրանսֆորմացված HT1080 բջիջների, մարդու սուր լիմֆոցիտային էլեկեմիայի CCRF-CEM T-բջիջների և չինական համատերի ձվարանների էպիթելային CHO բջիջների տարբեր զգայնությունը միտոմիցին C-ի, բլեոմիցինի և ցիսպլատինի նկատմամբ:

ԴՆԹ-կոմետ մեթոդի բջջային և ոչ բջջային տարբերակների կիրառմամբ գնահատվել են նոր պոտենցիալ հակաքաղցկեղային պորֆիրինների՝ TButPyP(4)-ի, FeTButPyP(4)-ի և CoTOEPyP(4)-ի գենաթունային հատկությունները մարդու էլեկոցիտներում: Բացահայտվել է, որ պորֆիրինները ոչ բջջային համակարգում առաջացնում են ավելի շատ ԴՆԹ-ի վնասվածքներ, քան բջիջներում: Հետևաբար, պորֆիրինները կարող են ուղղակիորեն ազդել ԴՆԹ-ի վրա և հանգեցնել կտրվածքների ձևավորման ինտերկալյացիայի կամ արտաքին միացման հատվածներում: Մարդու նորմալ էլեկոցիտներում գնահատվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների տարբեր մակարդակներ ունեցող կոմետների հարաբերական հաճախականությունը: Ցույց է տրված պորֆիրիններով ինդուկցված ԴՆԹ-ի վնասվածքների բաշխման կախվածությունը թեստավորվող մոդելից (բջջային և ոչ բջջային), ինչպես նաև պորֆիրինների կառուցվածքից և խտությունից:

FISH և ԴՆԹ-կոմետ մեթոդների համակցված կիրառմամբ կատարվել է ԴՆԹ-ի վնասվածքների վերլուծություն: Մշակվել և փորձարկվել է կոմետների պատրաստուկների վրա թելոմեր-սպեցիֆիկ պեպտիդ նուկլեինաթթվային (PNA) զոնդերի հիբրիդացման մեթոդ, որի իրականացումը թույլ տվեց առաջին անգամ գնահատել ամբողջ ԴՆԹ-ի և թելոմերների վնասվածքների մակարդակը նույն բջիջներում:

Ուսումնասիրված է միտոմիցին C-ով, բլեոմիցինով և ցիսպլատինով ինդուկցված ԴՆԹ-ի վնասվածքների տեղայնացումը մարդու էլեկոցիտներում և HT1080, CCRF-CEM, CHO բջիջներում թելոմերային PNA զոնդերի կիրառմամբ կոմետների պատրաստուկների վրա: Ցույց է տրված, որ մարդու էլեկոցիտներում միտոմիցին C-ով և բլեոմիցինով ինդուկցված վնասվածքները հավասարաչափ են բաշխված ԴՆԹ-ում և թելոմերային հատվածներում, իսկ ցիսպլատինը առաջացնում է ԴՆԹ-ի կցակարեր առավելապես թելոմերային հատվածներում: Բլեոմիցինի ազդեցության հետևանքով HT1080 բջիջներում թելոմերներն ավելի քիչ են վնասվում քան ամբողջ ԴՆԹ-ն, ի տարբերություն CCRF-CEM և CHO բջիջների:

Աշխատանքի արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ FISH մեթոդի համակցված կիրառումը միկրոկորիզային ու ԴՆԹ-կոմետ մեթոդների հետ արդյունավետ է քրոմոսոմների և ԴՆԹ-ի վնասվածքների ու մուտագենների ազդման թիրախների միաժամանակ վերլուծության համար և կարող է կիրառվել գենետիկական թունաբանության մեջ տարբեր մուտագեն գործոնների ազդեցության առանձնահատկությունները գնահատելու համար:

HOVHANNISYAN GALINA GEORGY

LOCALIZATION OF DNA AND CHROMOSOMAL DAMAGE  
IN HUMAN CELLS

SUMMARY

Mutagen-induced damages are distributed unequally across the genome. Nonrandom distribution of breakpoints may result from the interaction of primary lesions in chromosomal DNA with structure and localization of chromosomes in interphase nuclei at the time of exposure to mutagen. It depends also on the activity of repair in different loci of genome.

Progress in the study of distribution of DNA damage in genome depends on elaboration of new approaches to their identification. The necessity to develop new approaches is caused by the limited capacity of the existing standard methods for assessing the genotoxicity of environmental factors. Methods of molecular genetics based on the combination of fluorescence in situ hybridization (FISH) with the comet assay or micronuclei test proved to be promising approaches for recognition and localization of DNA and chromosome damage in the genome of individual cells. These combined techniques permit to elaborate new biomarkers of mutagenic effects. The localization of mutagenic action targets in human cells using combination of FISH with comet and micronuclei assays has been realized in the thesis.

**Analysis of chromosomal damage using micronucleus test.** Chromosome damages induced by model nutrients - ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA), and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (suggested to be putative risk factors of colorectal carcinogenesis) and butyrate, formed by bacterial fermentation of plant foods, in HT29 colon carcinoma cells have been investigated using the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) test. The obtained results demonstrate, for the first time, the genoprotective activity of butyrate against Fe-NTA and  $H_2O_2$ -induced chromosome damage.

**Analysis of chromosomal damage using micronucleus test combined with FISH.** Localization of chromosome damages on micronuclei, induced by antitumor drug mitomycin C in human leukocytes using FISH technique with application of centromeric and whole chromosome painting probes has been realized.

It was shown that material derived from chromosomes 9, 16 and female X-chromosome was overrepresented in mitomycin C-induced micronuclei. There was no correlation between interphase position, size, and gene density of the studied chromosomes and their migration in micronuclei. The structure of chromatin has been discussed as a major determinant of non-random mitomycin C-induced chromosome micronucleation.

**Analysis of DNA damage using the comet assay.** DNA damage evaluation by the comet assay has revealed different sensitivity of normal human leukocytes and transformed cell lines HT1080, CCRF-CEM and CHO (derived from human fibrosarcoma, human T-cell acute lymphocytic leukemia and Chinese hamster ovary, respectively) toward antitumor drugs mitomycin C, bleomycin and cisplatin. The genotoxicity of new potential antitumor porphyrins TButPyP(4), FeTButPyP(4) and CoTOEPyP(4) in human leukocytes using cellular and acellular versions of the comet assay has been analyzed. Higher level of porphyrins-induced DNA damages in acellular system compared with cellular is demonstrated, that allows to assume, that porphyrins are able to act directly on DNA and induce DNA breaks in the sites of intercalation and/or outside binding.

Analysis of distribution of cells with different levels of porphyrins-induced DNA damage using the comet assay permitted to evaluate alteration of relative frequencies of comets with diverse levels of DNA damage in different experimental conditions. The dependence of distribution on a testing model (cellular-acellular) and porphyrin's structure and concentration is shown.

**Analysis of DNA damage using the comet assay combined with FISH.** For the first time, telomere-specific peptide nucleic acid (PNA) hybridization probes were applied in comet-FISH to detect levels of total DNA damage and damage associated with telomeric sequences in the same cells.

Localization of mitomycin C-, bleomycin- and cisplatin-induced DNA damage in human leukocytes and HT1080, CCRF-CEM and CHO cells with PNA probes application on comets has been analyzed. Random distribution of mitomycin C- and bleomycin-induced damage in total DNA, and telomeric sequences and preferentially telomeric action of the cisplatin has been shown in leukocytes. In HT1080 cells telomeres were damaged with lower and in CCRF-CEM and CHO cells with higher frequency compared with total DNA.

In conclusion, it is confirmed that FISH technique in combination with the comet and micronuclei assays is a useful tool for simultaneous analysis of overall DNA and chromosome damages, and recognition of targets of mutagen action and can be successfully applied in genetic toxicology for evaluation of different mutagens.