

== МАТЕРИАЛЫ VII МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ==
“МЕДИЦИНСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ
ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ”
(ТОМСК, 21–22 МАРТА 2023 г.)

УДК 577.2:575.224.23:612.112:57.085.23:539.1.047

**ОЦЕНКА СТЕПЕНИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ
ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ *IN VITRO***

© 2024 г. О. С. Цымбал^{1,*}, Д. С. Исубакова¹, Е. В. Брониковская¹,
А. Ф. Николаева², В. О. Сигин², А. И. Калинин², В. М. Кириллов²,
Ж. А. Старцева³, Н. В. Литвяков^{1,3}, И. В. Мильго^{1,4}, Р. М. Тахауов^{1,4}

¹Северский биофизический научный центр

Федерального медико-биологического агентства, Северск, Россия

²Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова Министерства науки
и высшего образования Российской Федерации, Москва, Россия

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

⁴Сибирский государственный медицинский университет
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

*E-mail: mail@sbrc.seversk.ru, olga-tsymbal@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 30.02.2024 г.

Принята к публикации 27.03.2024 г.

Метилирование ДНК является одним из процессов эпигенетической регуляции генома, который чувствителен к влиянию эндогенных и экзогенных факторов. Воздействие ионизирующего излучения на геном сопровождается изменением степени метилирования ДНК, которое может иметь дозозависимый характер и сохраняться длительное время после радиационного воздействия. Задачей исследования являлась оценка степени метилирования ДНК лимфоцитов крови после однократного воздействия γ -излучения в дозе 1.5 Гр с использованием широкогеномного бисульфитного секвенирования. В исследование было включено десять условно здоровых мужчин — работников объекта использования ионизирующего излучения, не подвергавшихся радиационному воздействию и не страдающих хроническими заболеваниями. Материалом служила цельная кровь: 0 Гр (контрольные образцы) и 1.5 Гр (экспериментальные образцы после воздействия γ -излучения). После облучения с последующим культивированием цельной крови проводили выделение ДНК и бисульфитное секвенирование ограниченных наборов геномных локусов (Reduced representation bisulfite sequencing) с использованием фермента рестрикции XmaI (XmaI-RRBS). Выявлен 41 ген, среди которых 26 генов (*HOXD4*, *PAD12*, *FOXP1*, *FTCD*, *PRDM16*, *TOM1*, *PPP1R14A*, *FLNB*, *OR1F1*, *RARA*, *CRTAC1*, *AP5B1*, *ARL5C*, *NOC2L*, *MAMDC4*, *FGFRL1*, *PPFIA3*, *CUX2*, *ANKRD20A19P*, *FAM83H-AS1*, *CBFA2T3*, *POLN*, *MIR4458HG*, *FNBP1*, *SPIRE2* и *ZSCAN10*) имеют тенденцию к гипометилированию ДНК, а 15 генов (*CHRNA4*, *SEPTIN9*, *ZNF174*, *ELK3*, *NFAM1*, *ALG10*, *SOX8*, *KLHL30*, *UR11*, *HBZ*, *KLIF14*, *MYO16*, *MYEOV*, *DMKN* и *PAX7*) имеют тенденцию к гиперметилированию ДНК, отмеченных по крайней мере у 50% экспериментальных образцов. Таким образом, выявленные в настоящем исследовании гены могут быть перспективными маркерами радиационного воздействия и в дальнейшем использоваться для разработки нового вида биологической дозиметрии — эпигеномной дозиметрии персонала, контактирующего в ходе своей профессиональной деятельности с источниками ионизирующего излучения.

Ключевые слова: метилирование ДНК, однократное воздействие γ -излучения, лимфоциты крови, широкогеномное бисульфитное секвенирование (XmaI-RRBS)

DOI: 10.31857/S0869803124020021, **EDN:** NBNXKS

В настоящее время широко распространено изучение таких эпигенетических процессов, как метилирование ДНК, которое участвует в регуляции экспрессии генов, в клеточной дифференцировке, репликации, репарации ДНК и других клеточных процессах. Изменение степени метилирования ДНК в составе генов подвержено влиянию эндогенных и

экзогенных факторов. Например, неметилированное состояние CpG-динуклеотидов в промоторной области генов лейкотриеновых рецепторов В4 (*LTB4R* и *LTB4R2*), регулирующих прогрессию опухоли, является потенциальным маркером повышенной инвазивности опухолевых клеток при раке молочной железы [1]. Радиационное воздействие на организм

человека также сопровождается изменением степени метилирования ДНК. Lee Y. и др. (2015) отмечают снижение уровня глобального метилирования ДНК у работников, подвергшихся радиационному облучению при выполнении своих профессиональных обязанностей, по сравнению с контрольной группой [2]. Кузьминой Н.С. и др. (2014, 2016) выявлено aberrантное метилирование CpG-островков промоторов генов клеточного цикла (*RASSF1A*, *CDKN2A*, *p16/INK4A*, *p14/ARF*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*), которое сохраняется в отдаленные сроки после хронического воздействия ионизирующего излучения (ИИ) в лейкоцитах крови человека [3, 4]. Отмечается дозозависимое гиперметилирование *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1*, которое сохраняется годы и десятилетия после перенесенного пролонгированного внешнего (γ -излучение) и сочетанного (γ - и α -излучение) облучения [5]. Наши предварительные исследования также выявили связь степени метилирования проапоптического гена *Bak1* с дозой хронического внешнего облучения в лимфоцитах крови работников объекта использования ионизирующего излучения [6]. Изучение эпителиоцитов слизистой оболочки бронхов человека после рентгеновского облучения в дозах 0 и 1 Гр также показало связь степени метилирования генов с дозой γ -излучения, при этом CpG-сайты одних генов были гиперметилированы, других — гипометилированы [7].

Таким образом, оценка степени метилирования генов лимфоцитов крови при однократном воздействии γ -излучения является актуальной задачей, которая позволит в дальнейшем выявить маркеры радиационного воздействия, перспективные для биологической дозиметрии персонала, контактирующего с источниками ИИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследование включало 10 человек мужского пола (20–34 лет) — работников объекта использования ИИ, не подвергавшихся воздействию ИИ и не страдающих хроническими заболеваниями.

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

У каждого донора брали добровольное информированное согласие на взятие биоматериала (крови) и обработку персональных данных.

Материал. Кровь у доноров забирали из локтевой вены в пробирки Vacuette с Li-гепарином (Greiner Bio-one, Австрия) с иглой Visio Plus для системы Vacuette (Greiner Bio-one, Австрия). Далее кровь от каждого донора разделяли на две части: контрольный (0 Гр) и экспериментальный образцы. Экспериментальные образцы подвергали однократному воздействию γ -излучения *in vitro* в дозе 1.5 Гр. Облучение крови проводили с помощью γ -терапевтического аппарата Theratron Equinox (Канада), предназначенного для дистанционного облучения. Радиоактивный источник ^{60}Co (мощность дозы 1.93 Гр/мин, $E\gamma \approx 1.25$ МэВ). Время от взятия крови до ее облучения с учетом транспортировки образцов составляло не более 1 ч. Контрольные образцы не подвергали облучению (0 Гр), при этом они находились в тех же условиях (транспортировка, температурный режим), что и экспериментальные образцы. Облучение и культивирование контрольных и экспериментальных образцов осуществляли в день взятия крови, после чего оценивали степень метилирования ДНК в лимфоцитах крови.

Методика. Культивирование контрольных и экспериментальных образцов цельной крови проводили в стерильных условиях с использованием ламинарного шкафа Kojair (Финляндия). Кровь в объеме 4 мл смешивали с 16 мл питательной среды RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), с предварительно добавленным L-глутамином (ПанЭко, Россия), 4 мл эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия) и 0.4 мл фитогемагглютинаина (ПанЭко, Россия). После чего кровь инкубировали в культуральных флаконах при 37°C в орбитальном шейкере-инкубаторе Biosan Sia (Латвия) в течение 46.5 ч.

После завершения инкубации культуральную суспензию поровну разделяли на 2 пробирки объемом 15 мл, затем центрифугировали 8 мин при 2000 об./мин с использованием центрифуги Eppendorf Centrifuge 5702R (Германия), после культуральную суспензию отмывали физиологическим раствором от гепарина 3 раза. Далее осадок аликвотировали в пробирки типа эппендорф по 700 мкл и замораживали сначала при –20°C, затем при –80°C (в течение 5–6 сут).

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

натрия). Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop-1000 (США).

Степень метилирования ДНК контрольных и экспериментальных образцов определяли методом бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов — RRBS (Reduced representation bisulfite sequencing) с использованием рестриктазы XmaI (метод XmaI-RRBS) [8]. Секвенирование геномных библиотек XmaI-RRBS осуществляли с использованием системы Ion Personal Genome Machine (PGM), наборов для секвенирования Ion PGM 200 Sequencing Kit и Ion 318 Chip (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Концент-

рацию ДНК библиотек определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (США).

Статистические методы. Данные секвенирования обрабатывали с использованием стандартного программного обеспечения Ion Torrent Suite™. Cutadapt 1.15 применяли для обрезки адаптерных последовательностей, с помощью программного пакета Bismark 0.20 выполняли выравнивание обработанных бисульфитом натрия прочтений и получение данных о метилированных и неметилированных цитозинах. Дифференциально метилированные цитозины отбирали из данных XmaI-RRBS с использованием пакета Reproducibility-Optimized Test Statistic (ROTS) с возможностью парного тестирования [9]. Контроль качества

Таблица 1. Средняя частота метилирования CpG-динуклеотидов генов до и после воздействия γ -излучения в дозе 1.5 Гр *in vitro* по крайней мере у 50% исследуемых образцов

Table 1. The average frequency of methylation of CpG-dinucleotides of genes before and after exposure to gamma radiation at a dose of 1.5 Gy *in vitro* in at least 50% of the researched samples

Ген	Локализация	Средняя частота метилирования CpG-динуклеотидов		p-value	FDR
		до облучения	после облучения		
<i>HOXD4</i>	downstream	0.6012	0.2008	0.0001	0.6667
<i>PADI2</i>	upstream	0.4844	0.2227	0.0006	0.7391
<i>FOXK1</i>	upstream	0.7021	0.4965	0.0010	0.8018
<i>FTCD</i>	inside intron	0.5681	0.2892	0.0012	0.8018
<i>PRDM16</i>	inside intron	0.4639	0.1592	0.0018	0.8018
<i>TOM1</i>	inside intron	0.7502	0.4582	0.0019	0.8018
<i>PPP1R14A</i>	inside exon	0.4253	0.1842	0.0030	0.8018
<i>FLNB</i>	downstream	0.7349	0.5187	0.0041	0.8018
<i>OR1F1</i>	upstream	0.4176	0.2178	0.0061	0.8018
<i>RARA</i>	inside exon	0.6946	0.4587	0.0082	0.8018
<i>CRTAC1</i>	inside intron	0.6370	0.3819	0.0088	0.8018
<i>AP5B1</i>	inside exon	0.6818	0.4629	0.0090	0.8018
<i>ARL5C</i>	inside intron	0.5196	0.3769	0.0118	0.8018
<i>NOC2L</i>	promoter	0.3271	0.1640	0.0139	0.8018
<i>MAMDC4</i>	inside intron	0.3947	0.1942	0.0149	0.8018
<i>FGFRL1</i>	downstream	0.8622	0.6732	0.0152	0.8018
<i>PPFIA3</i>	inside intron	0.4090	0.1967	0.0243	0.8018
<i>CUX2</i>	inside intron	0.6984	0.4791	0.0245	0.8018
<i>ANKRD20A19P</i>	inside exon	0.5022	0.4306	0.3088	0.8018
<i>FAM83H-AS1</i>	inside intron	0.1853	0.0766	0.0287	0.8018
<i>CBFA2T3</i>	promoter	0.5302	0.3567	0.0296	0.8018
<i>POLN</i>	inside intron	0.8402	0.6919	0.0297	0.8018
<i>MIR4458HG</i>	inside intron	0.2580	0.1316	0.0329	0.8018
<i>FNBP1</i>	inside exon	0.3181	0.1933	0.0364	0.8018
<i>SPIRE2</i>	inside intron	0.5149	0.3188	0.0383	0.8018
<i>ZSCAN10</i>	promoter	0.4170	0.3154	0.0494	0.8018

Гипометилированные гены

Гиперметилированные гены	<i>CHRNA4</i>	inside exon	0.6516	0.9208	0.0003	0.7391
	<i>SEPTIN9</i>	inside intron	0.1502	0.4356	0.0010	0.8018
	<i>ZNF174</i>	downstream	0.4794	0.8072	0.0016	0.8018
	<i>ELK3</i>	inside intron	0.3344	0.6106	0.0021	0.8018
	<i>NFAM1</i>	downstream	0.2933	0.5862	0.0021	0.8018
	<i>ALG10</i>	downstream	0.5457	0.7752	0.0023	0.8018
	<i>SOX8</i>	downstream	0.4407	0.7027	0.0033	0.8018
	<i>KLHL30</i>	inside intron	0.4844	0.7123	0.0070	0.8018
	<i>URI1</i>	downstream	0.7134	0.9268	0.0130	0.8018
	<i>HBZ</i>	downstream	0.8045	0.9215	0.0162	0.8018
	<i>KLF14</i>	inside exon	0.2003	0.4103	0.0193	0.8018
	<i>MYEOV</i>	downstream	0.5093	0.6598	0.0285	0.8018
	<i>MYO16</i>	inside exon	0.3204	0.5519	0.0361	0.8018
	<i>DMKN</i>	inside intron	0.6150	0.7652	0.0436	0.8018
	<i>PAX7</i>	inside intron	0.2057	0.3638	0.0487	0.8018

Примечание. Upstream — восходящие нетранслируемые области, promoter — промотор, inside intron — область интрона, inside exon — область экзона, downstream — нисходящие нетранслируемые области. FDR (False discovery rate) — ожидаемая доля ложных отклонений.

Note. Upstream — ascending untranslated regions, inside intron — intron region, inside exon — exon region, downstream — descending untranslated regions. FDR — false discovery rate.

обработанных прочтений осуществляли с помощью инструмента FASTQC [10]. Расчеты проводили с использованием статистического языка программирования R 3.6.3 [11]. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene Ontology, далее GO) был выполнен с использованием пакета clusterProfiler с функцией enrichGO. В качестве предельного значения для дифференциально метилированных цитозинов было установлено изменение среднего значения метилирования b -value на ± 0.20 (20%) между контрольными и экспериментальными образцами. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ широкогеномного бисульфитного секвенирования (XmaI-RRBS) показал, что после облучения образцов *in vitro* в дозе 1.5 Гр CpG-динуклеотиды некоторых генов стремятся либо к гипометилированному, либо к гиперметилированному состоянию, что отмечено по крайней мере у 50% экспериментальных образцов. Выявлен 41 ген, среди которых 26 генов (*HOXD4*, *PADI2*, *FOXK1*, *FTCD*, *PRDM16*, *TOM1*, *PPP1R14A*, *FLNB*, *OR1F1*, *RARA*, *CRTAC1*, *AP5B1*, *ARL5C*, *NOC2L*, *MAMDC4*, *FGFRL1*, *PPFIA3*, *CUX2*, *ANKRD20A19P*, *FAM83H-AS1*, *CBFA2T3*, *POLN*, *MIR4458HG*, *FNBP1*, *SPIRE2* и *ZSCAN10*) имеют тенденцию к гипометилированию CpG-динуклеотидов, а 15 генов (*CHRNA4*, *SEPTIN9*,

ZNF174, *ELK3*, *NFAM1*, *ALG10*, *SOX8*, *KLHL30*, *URI1*, *HBZ*, *KLF14*, *MYO16*, *MYEOV*, *DMKN* и *PAX7*) имеют тенденцию к гиперметилированию CpG-динуклеотидов. В табл. 1 представлены средние частоты метилирования CpG-динуклеотидов 41 гена до и после облучения.

Распределение дифференцированно метилированных цитозинов относительно областей гена (экзонов, интронов, промоторов, восходящих и нисходящих нетранслируемых (некодирующих) областей) у экспериментальных образцов показано на рис. 1. Для цитозинов, которые изменили статус метилирования в CpG-динуклеотидах после воздействия γ -излучения на кровь *in vitro*, гипометилирование ДНК наиболее характерно для восходящих нетранслируемых областей и области промотора, а гиперметилирование ДНК в большей степени характерно для нисходящих нетранслируемых областей.

Было выявлено частичное гиперметилирование после облучения лимфоцитов крови *in vitro* внутри интрона гена *GSTP1* (рис. 2), для которого ранее было показано aberrantное метилирование промоторной области после хронического воздействия ИИ [3, 4].

Анализ обогащения по функциональной принадлежности с использованием GO биологических процессов показал, что гены с гипометилированными CpG-динуклеотидами после облучения

играют роль в положительной регуляции дифференцировки жировых клеток, отрицательной регуляции развития хрящевой ткани, развитии обонятельных луковиц, обонятельных долей и движения на основе актиновых микрофиламентов. Гены с гиперметилированными CpG-динуклеотидами после облучения участвуют в катаболизме

пуриновых рибонуклеотидов, в регуляции дифференцировки миобластов, активации лейкоцитов, а также рецепторов, связанных с G-белками, передаче сигналов с помощью фермента фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и дифференцировке различных клеток. Топ-20 биологических процессов приведен на рис. 3.

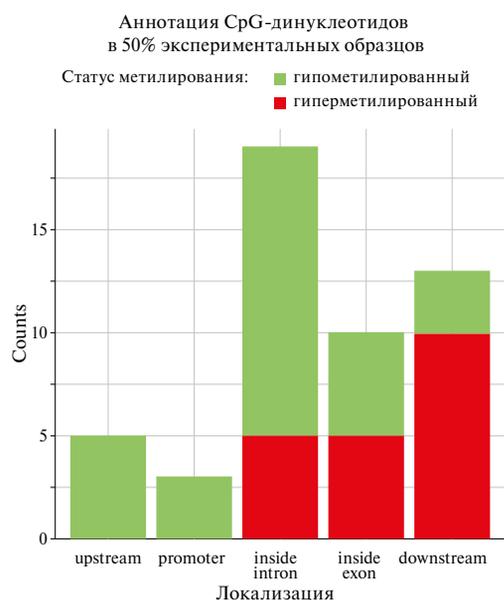


Рис. 1. Гистограмма для дифференциально метилированных цитозинов с расположением относительно элементов гена по оси X и подсчетом по оси Y для цитозинов, которые изменили статус метилирования, выявленных по крайней мере у 50% экспериментальных образцов.

Примечание. Upstream — восходящие нетранслируемые области, promoter — промотор, inside intron — область интрона, inside exon — область экзона, downstream — нисходящие нетранслируемые области.

Fig. 1. Annotation barplots for differentially methylated cytosines with location relative to gene elements on x-axis and counts on y-axis for cytosines that changed methylation status detected in at least 50% of the experimental samples. Note. Upstream — ascending untranslated regions, inside intron — intron region, inside exon — exon region, downstream — descending untranslated regions.

GSTP1 abnormal methylation

Genome build: hg19, location: chr11:67,351,775-67,351,814; inside intron



Рис. 2. Пример визуализации аномального метилирования ДНК внутри интрона *GSTP1* после облучения лимфоцитов крови *in vitro*, полученный с использованием геномного браузера Integrative Genomic Browser (IGV).

Примечание. На верхней панели показан результат высокопроизводительного параллельного бисульфитного секвенирования образца ДНК до облучения; на нижней панели — после облучения в дозе 1.5 Гр. Каждая дорожка представляет последовательность (считывание) одной молекулы из образца; красный цвет — метилированные цитозины, синий — неметилированные цитозины в контексте CpG. На рисунке представлен фрагмент из 40 пар оснований (chr11:67,351,775-67,351,814); эталонная последовательность генома (hg19 человека) находится внизу. Показанный фрагмент находится в пределах острова *GSTP1* 5'CpG (зеленый).

Fig. 2. An example of visualization of abnormal methylation inside intron of the *GSTP1* gene after *in vitro* irradiation of blood lymphocytes obtained using the Integrative Genomic Browser (IGV).

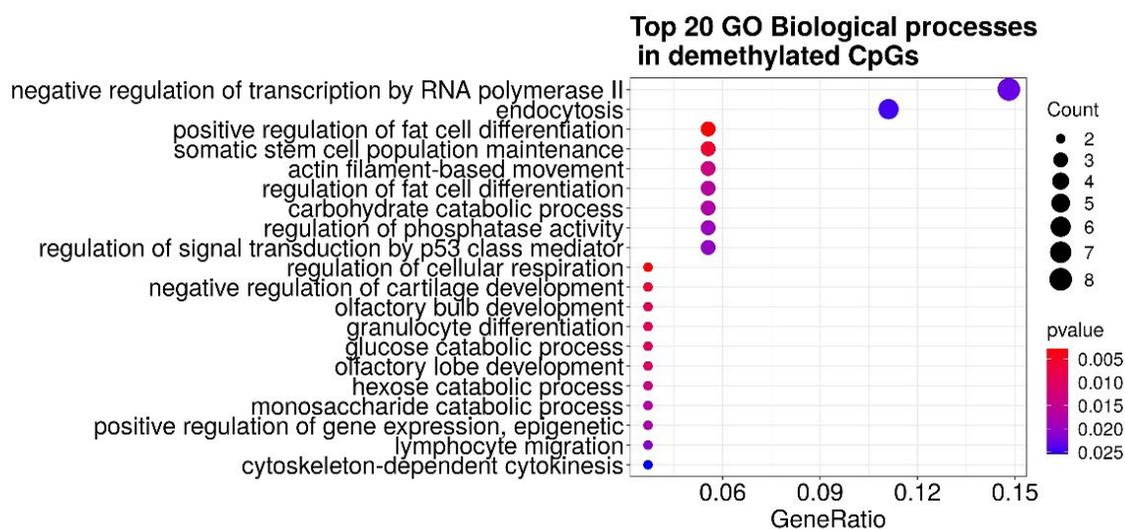
Note. The upper panel shows the result of high-throughput parallel bisulfite sequencing of the DNA sample before irradiation; the bottom panel, the result of DNA sequencing of the sample after irradiation with 1.5 Gy. Each track represents a sequence (read) of a single molecule from the sample; red is for methylated cytosines and blue is for nonmethylated cytosines in the CpG context. A fragment of 40 base pairs (chr11:67,351,775-67,351,814) is presented; the reference genome sequence (Human hg19) is at the bottom. The fragment shown is within the *GSTP1* 5'CpG island (green).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам ХмаI-RRBS изменения степени метилирования CpG-динуклеотидов по крайней мере у 50% образцов после однократного воздействия γ -излучения выявлены гены, которые участвуют в важных клеточных процессах: транскрипция, апоптоз, аутофагия, пролиферация и др. Например, *FOXK1* (forkhead box K1), гипометилированный после облучения, участвует в индукции аутофагической гибели в ответ на повреждение ДНК; белки FOXK (*FOXK1* и *FOXK2*) функционируют как супрессоры транскрипции [12]. Гипометилирование *FOXK1* отмечается в гепатоцитах,

при гепатоцеллюлярной карциноме человека [13]. Также отмечается снижение степени метилирования этого гена с возрастом [14, 15]. Другой ген, имеющий тенденцию к гипометилированию CpG-динуклеотидов, *CBFA2T3* (*CBFA2/RUNX1* partner transcriptional co-repressor 3), участвует в ингибировании дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза [16]. Гипометилирование *FOXK1* и *CBFA2T3* наблюдается после облучения культуры иммортализованных эпителиоцитов бронхов человека в дозе 1 Гр [7]. *AP5B1* (adaptor related protein complex 5 subunit beta 1) принимает участие в аутофагии и внутриклеточном транспорте [17].

A



B

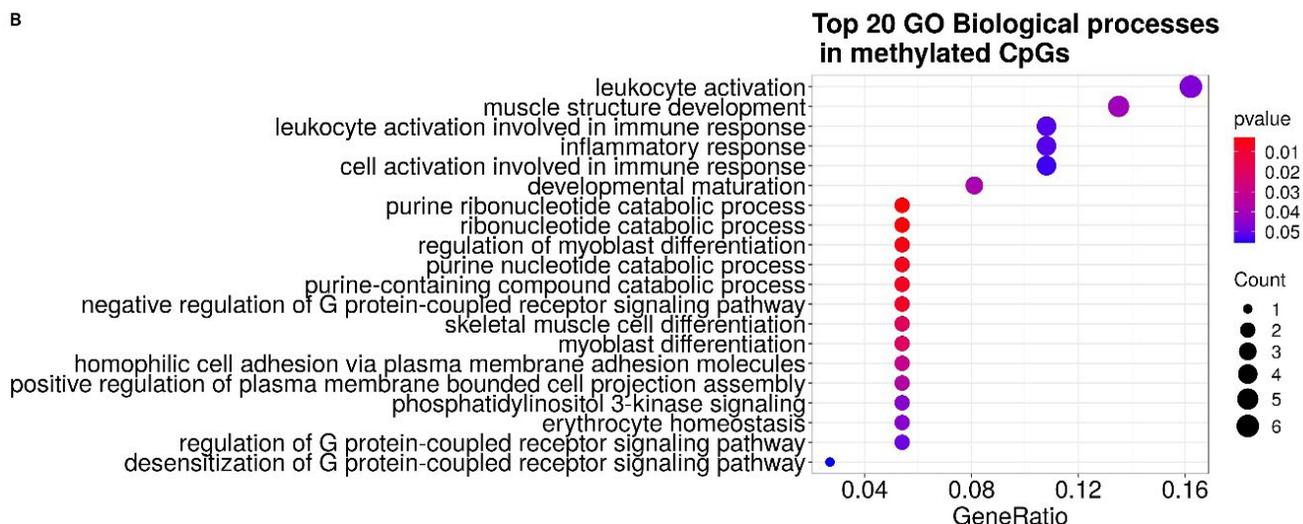


Рис. 3. Топ-20 биологических процессов онтологии генов (GO) с представленностью (количество входных генов в процессе / количество всех входных генов) по оси X и терминами GO по оси Y в гипометилированных (А) и в гиперметилированных (Б) CpG-динуклеотидах, выявленных по крайней мере у 50% экспериментальных образцов. Примечание. Count — число выявленных генов, которые участвуют в биологическом процессе.

Fig. 3. Top 20 enriched Gene Ontology (GO) Biological processes terms with GeneRatio (Num. of genes in process/Num. of total input genes) on X-axis and GO terms on Y-axis in CpGs demethylated (A) and CpGs hypermethylated (B) detected in at least 50% of the experimental samples.

Note. Count — the number of identified genes that are involved in the biological process.

Гиперметилирование CpG-динуклеотидов, выявленное по крайней мере у 50% облученных образцов, наблюдалось у *HBZ* (hemoglobin subunit zeta), который участвует в миграции и пролиферации клеток при Т-клеточном лейкозе [18]. Отмечалась также тенденция к снижению экспрессии *HBZ* после воздействия “малых” (150 мГр) доз ИИ [19].

Дифференцированно метилированные цитозины у экспериментальных образцов распределены неравномерно относительно областей гена. Наиболее характерно гипометилирование CpG-динуклеотидов в области промотора (рис. 1). Исследование Kennedy E.M. и др. (2018) показало, что облучение рентгеновским излучением (1 Гр) эпителиоцитов слизистой оболочки бронхов человека приводит в большей степени к гипометилированию, чем к гиперметилированию CpG-сайтов. При этом гипометилирование происходило, в первую очередь, в более высоко метилированных CpG-сайтах. Помимо этого, выявлено, что воздействие рентгеновского излучения отражается в основном на транскрибируемой области гена, в меньшей степени — на активных/доступных промоторах и энхансерах [7]. Снижение степени метилирования генов было обнаружено после воздействия ИИ на лимфоциты человека в дозе 2 Гр [20]. После радиационного воздействия (2 и 5 Гр) на опухолевые клетки при раке толстой кишки наблюдалось гипометилирование промоторных областей и увеличение экспрессии генов (*ANGPT1*, *APBB2*, *CHGA*, *CTGF*, *IFI6*, *IGLON5*, *SLC43A2*) [21]. Воздействие γ -излучения в дозе 7 Гр на клетки менингиомы человека приводило к гипометилированию промотора и увеличению экспрессии урокиназного активатора плазминогена (urokinase plasminogen activator, uPA), также наблюдалось снижение экспрессии ДНК-метилтрансферазы 1 (*DNMT1*) [22]. В свою очередь, в других исследованиях отмечалось гиперметилирование ДНК в промоторной области генов. Гиперметилирование CpG-островков промоторов генов было выявлено Кузьминой Н.С. и др. (2016, 2017, 2018) при хроническом воздействии ИИ на организм человека [4, 23, 24]. Повышение степени метилирования промоторной области гена клеточного цикла *CCND2* отмечалось Chen X. и др. (2015) в радиационно устойчивых клетках плоскоклеточного рака [25]. Таким образом, гипо- или гиперметилирование промоторной области генов, вероятно, зависит от типа клеток, способа и продолжительности радиационного воздействия.

Частичное гиперметилирование ДНК лимфоцитов крови после воздействия γ -излучения *in vitro* было обнаружено внутри интрона гена *GSTP1* (рис. 2). Белки *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) являются членами семейства ферментов глутатион-S-трансферазы (GSTs), которые играют важную роль в детоксикации, катализируя конъюгацию многих гидрофобных и электрофильных соединений с восстановленным глутатионом. Гиперметилирование этого гена было обнаружено в опухолевых клетках предстательной железы [26, 27]. Mian O.Y. и др. (2016) показали, что длительное воздействие “малых” доз ИИ приводит к снижению активности *GSTP1*, что способствует выживанию опухолевых клеток при раке предстательной железы [28]. Исследование Кузьминой Н.С. и др. (2014, 2018, 2019) показало, что хроническое воздействие γ -излучения на организм человека (на примере ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС) приводит к aberrантному гиперметилированию CpG-островков промотора *GSTP1* лейкоцитов крови [3, 5, 24]. Помимо этого, было отмечено сохранение aberrантного гиперметилирования *GSTP1* в течение длительного времени после облучения [3, 24] и зависимость степени метилирования этого гена от дозы γ -излучения [5]. Таким образом, наше исследование подтверждает ранее полученные результаты в отношении метилирования гена *GSTP1*.

Анализ обогащения по функциональной принадлежности биологических терминов GO генов, имеющих гипометилированные цитозины в экспериментальных образцах, показал связь с процессами дифференцировки клеток, развитием, миграцией лимфоцитов, положительной эпигенетической регуляцией экспрессии генов и др. Примечательно гипометилирование цитозинных генов, связанных с аутофагической гибелью и апоптозом, которые могут определять стимуляцию этих процессов после облучения ИИ для восстановления и элиминации нерепарируемых поврежденных клеток. Гиперметилированные после облучения ИИ цитозины генов, которые согласно анализу обогащения по функциональной принадлежности биологических терминов GO, связаны с процессами передачи внутриклеточных сигналов, катаболическими процессами, воспалительным и иммунным ответами, соответственно, могут обуславливать торможение этих процессов после радиационного воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования были выявлены гены, которые имели тенденцию к гипометилированию (26 генов) и гиперметилированию (15 генов) CpG-динуклеотидов после однократного облучения образцов крови *in vitro* в дозе 1.5 Гр. Данные гены могут стать потенциальными кандидатами для изучения влияния ИИ на внутриклеточные и организменные процессы, а также могут быть перспективными маркерами для эпигеномной дозиметрии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность медицинским физикам отделения лучевой терапии Научно-исследовательского института онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра И.А. Милойчиковой и Н.Д. Тургуновой за помощь в облучении биоматериала (крови).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке Федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2035 года”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинин А.И., Сигин В.О., Немцова М.В. и др. Аномальное деметилирование и эктопическая экспрессия генов лейкотриеновых рецепторов LTB4R/LTB4R2 при раке молочной железы. *Мед. генетика*. 2021;20(8):21–30. [Kalinkin A.I., Sigin V.O., Nemtsova M.V. et al. Abnormal demethylation and ectopic expression of leukotriene receptors genes LTB4R/LTB4R2 in breast cancer. *Medical Genetics*. 2021;20(8):21–30. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2021.08.21-30>
2. Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers. *Int. J. Radiat. Biol.* 2015;91(2):142–149. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
3. Кузьмина Н.С., Мязин А.Е., Лаптева Н.Ш., Рубанович А.В. Изучение aberrантного метилирования в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на ЧАЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2014;54(2):127–139. [Kuzmina N.S., Myazin A.E., Lapteva N.S., Rubanovich A.V. Study of aberrant methylation in blood leukocytes of liquidators of the chernobyl accident. *Radiat. Biology. Radioecology*. 2014;54(2):127–139. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803114020064>
4. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.V. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ. Res.* 2016;146:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
5. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся облучению в результате профессиональной деятельности: Мат. Рос. конф. с междунар. участием “Современные проблемы радиационной генетики”. Дубна, 2019. Дубна: Изд-во Объединенный институт ядерных исследований, 2019. С. 76–78. [Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al. Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans occupationally exposed to radiation. Materials of the Russian conference with international participation “Modern problems of radiation genetics”: Conf. proc. Dubna, 2019. Dubna: Izd-vo Joint Institute for Nuclear Research, 2019. P. 76–78. (In Russ.)].
6. Цымбал О.С., Исубакова Д.С., Брониковская Е.В. и др. Роль метилирования *Bak1* в индукции хромосомных aberrаций при хроническом низкоинтенсивном внешнем облучении. *Мед. радиология и радиац. безопасность*. 2020;65(5):29–34. [Tsybmal O.S., Isubakova D.S., Bronikovskaya E.V., et al. The role of *Bak1* methylation in the induction of chromosomal aberrations under chronic low-intensity external radiation. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65(5):29–34. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.12737/1024-6177-2020-65-5-29-34>
7. Kennedy E.M., Powell D.R., Li Z. et al. Galactic cosmic radiation induces persistent epigenome alterations relevant to human lung cancer. *Sci. Rep.* 2018;8(1):6709. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24755-8>
8. Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al. Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing. *Epigenomics*. 2017;9(6): 833–847. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0031>
9. Suomi T., Seyednasrollah F., Jaakkola M.K. et al. ROTS: An R package for reproducibility-optimized statistical testing. *PLoS Comput. Biol.* 2017;13(5):e1005562. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005562>
10. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed October 19, 2022.
11. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2020. Available at: <https://www.R-project.org/>. Accessed December 20, 2022.
12. Chen Y., Wu J., Liang G. et al. CHK2-FOXK axis promotes transcriptional control of autophagy programs. *Sci. Advances*. 2020;6(1):eaax5819. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5819>
13. Cao H., Chu X., Wang Zh. et al. High FOXK1 expression correlates with poor outcomes in hepatocellular carcinoma and regulates stemness of hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci.* 2019;228:128–134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.068>
14. Atsem St., Reichenbach J., Potabattula R. et al. Paternal age effects on sperm FOXK1 and KCNA7 methylation and transmission into the next generation. *Hum. Mol. Genet.* 2016;25(22):4996–5005. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw328>
15. Reichenbach J.R. Paternal age effects on sperm DNA methylation and its impact on the next generation.

- [dissertation for Doctoral] Würzburg; 2020. 106 p. Available at: https://www.researchgate.net/publication/339375571_Paternal_age_effects_on_sperm_DNA_methylation_and_its_impact_on_the_next_generation Accessed February 2, 2023.
16. Steinauer N., Guo Ch., Zhang J. The transcriptional corepressor CBFA2T3 inhibits all-trans-retinoic acid-induced myeloid gene expression and differentiation in acute myeloid leukemia. *J. Biol. Chem.* 2020;295(27):8887–8900. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013042>
 17. Calender A., Farnier P.A.R., Buisson A. et al. Whole exome sequencing in three families segregating a pediatric case of sarcoidosis. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(1):23. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0338-x>
 18. [Matsuoka M. Mechanism of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2010;37(1):10–13. (in Japan.)].
 19. [Fang F., Yu X.L., Niu D.S., Li J. Screening of candidate genes related to low-dose ionizing radiation based on transcriptome-proteome correlation research techniques. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases.* 2021;39(10):738–743. (in Chinese)]. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn121094-20200518-00267>
 20. Chaudhry M.A., Omaruddin R.A. Differential DNA methylation alterations in radiation-sensitive and -resistant cells. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):908–916. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1509>
 21. Bae J.-H., Kim J.-G., Heo K. et al. Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in colon cancer. *BMC Genomics.* 2015;16(1):56. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1229-6>
 22. Velpula K.K., Gogineni V.R., Nalla A.K. et al. Radiation-induced hypomethylation triggers urokinase plasminogen activator transcription in meningioma cells. *Neoplasia.* 2013;15(2):192–203. <https://doi.org/10.1593/neo.121334>
 23. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2017;54(4):341–356. [Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G., et al. Hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans in the remote period after radiation exposure. *Radiat. Biology. Radioecology.* 2017;54(4):341–356. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0869803117040014>
 24. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al. Gene hypermethylation in blood leukocytes in humans long term after radiation exposure – Validation set. *Environ. Pollut.* 2018;234:935–942. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.039>
 25. Chen X., Liu L., Mims J. et al. Analysis of DNA methylation and gene expression in radiation-resistant head and neck tumors. *Epigenetics.* 2015;10(6):545–561. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1048953>
 26. Zhao F., Olkhov-Mitsel E., van der Kwast T. et al. Urinary DNA methylation biomarkers for noninvasive prediction of aggressive disease in patients with prostate cancer on active surveillance. *J. Urology.* 2017;197(2):335–341. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.08.081>
 27. Patel P.G., Wessel Th., Kawashima A. et al. A three-gene DNA methylation biomarker accurately classifies early stage prostate cancer. *Prostate.* 2019;79(14):1705–1714. <https://doi.org/10.1002/pros.23895>
 28. Mian O.Y., Khattab M.H., Hedayati M. et al. GSTP1 Loss results in accumulation of oxidative DNA base damage and promotes prostate cancer cell survival following exposure to protracted oxidative stress. *Prostate.* 2016;76(2):199–206. <https://doi.org/10.1002/pros.23111>

Assessment of the Degree Of Dna Methylation in Lymphocytes after a Single Blood Irradiation *in vitro*

**O. S. Tsybal^{1,*}, D. S. Isubakova¹, E. V. Bronikovskaya¹,
A. F. Nikolaeva², V. O. Sigin², A. I. Kalinkin², V. M. Kirillov²,
Zh. A. Startseva³, N. V. Litviakov^{1,3}, I. V. Milto^{1,4}, R. M. Takhauov^{1,4}**

¹*Seversk Biophysical Research Center
of the Federal Medical-Biological Agency, Seversk, Russia*

²*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia*

³*Tomsk National Research Medical Center*

of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

⁴*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

**E-mail: mail@sbrc.seversk.ru, olga-tsybal@mail.ru*

DNA methylation is one of the processes of epigenetic regulation of the genome, which is sensitive to the influence of endogenous and exogenous factors. The effect of ionizing radiation on the genome is accompanied by a change in the degree of DNA methylation, which can be dose-dependent and persist for a long time after radiation exposure. The objective of the study was to assess the degree of DNA methylation of blood lymphocytes after a single exposure to gamma radiation at a dose of 1.5 Gy using wide-genome bisulfite sequencing. The study included 10 conditionally healthy male employees of the ionizing radiation facility who were not exposed to radiation and

did not suffer from chronic diseases. The material was whole blood: 0 Gy (control samples) and 1.5 Gy (experimental samples irradiated with gamma radiation). After irradiation with subsequent cultivation of whole blood, DNA isolation and bisulfite sequencing of limited sets of genomic loci (Reduced representation bisulfite sequencing) was performed using XmaI restriction enzyme (XmaI-RRBS). 41 genes were identified, including 26 genes (*HOXD4*, *PADI2*, *FOKK1*, *FTCD*, *PRDM16*, *TOM1*, *PPP1R14A*, *FLNB*, *ORIF1*, *RARA*, *CRTAC1*, *AP5B1*, *ARL5C*, *NOC2L*, *MAMDC4*, *FGFRL1*, *PPFIA3*, *CUX2*, *ANKRD20A19P*, *FAM83H-AS1*, *CBFA2T3*, *POLN*, *MIR4458HG*, *FNBP1*, *SPIRE2*, and *ZSCAN10*) have a tendency to hypomethylation DNA, and another 15 genes (*CHRNA4*, *SEPTIN9*, *ZNF174*, *ELK3*, *NFAM1*, *ALG10*, *SOX8*, *KLHL30*, *URI1*, *HBZ*, *KLF14*, *MYO16*, *MYEOV*, *DMKN*, and *PAX7*) tend to have hypermethylated state detected in at least 50% of the experimental samples. Thus, the genes identified in this study can be promising markers of radiation exposure and, in the future, be used to develop a new type of biological dosimetry – epigenomic dosimetry of personnel in contact with ionizing radiation sources in the course of their professional activities.

Keywords: DNA methylation, single exposure to gamma radiation, blood lymphocytes, genome-wide bisulfite sequencing (XmaI-RRBS)

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Цымбал Ольга Сергеевна (Tsybal Olga Sergeevna),
olga-tsybal@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2311-0451>

Исубакова Дарья Сергеевна (Isubakova Daria Sergeevna),
isubakova.daria@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5032-9096>

Брониковская Евгения Владимировна (Bronikovskaya
Evgenia Vladimirovna), Bronikev@gmail.com

<https://orcid.org/00000-0002-6486-5025>

Николаева Александра Фёдоровна (Nikolaeva Alexandra
Fedorovna), alex.ru97@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0002-3805-8879>

Сигин Владимир Олегович (Sigin Vladimir Olegovich),
sigin.vladimir@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-8020-3577>

Калинкин Алексей Игоревич (Kalinkin Alexey Igorevich),
alexeika2@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9215-4581>

Кириллов Владимир Михайлович (Kirillov Vladimir
Mikhailovich), 96vladkiri96@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-8762-1322>

Старцева Жанна Александровна (Startseva Zhanna
Alexandrovna), zhanna.alex@rambler.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4345-7719>

Литвяков Николай Васильевич (Litviakov Nicolay
Vasilievich), nvlitv72@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-0714-8927>

Мильто Иван Васильевич (Milto Ivan Vasilievich),
milto_bio@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9764-4392>

Тахауов Равиль Манихович (Takhauov Ravil Mani-
khovich), niirm2007@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1994-957X>

Вклад авторов. Цымбал О.С. — сбор и обработка био-материала, литературный обзор, подготовка текста статьи. Исубакова Д.С., Брониковская Е.В. — сбор и обработка биоматериала. Николаева А.Ф., Кириллов В.М. — проведение широкогеномного бисульфитного секвенирования (XmaI-RRBS). Калинкин А.И., Сигин В.О. — анализ и интерпретация данных. Литвяков Н.В. — разработка концепции и дизайна исследования. Старцева Ж.А. — планирование и организация дистанционного облучения биоматериала. Мильто И.В. — проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование. Тахауов Р.М. — проверка критически важного интеллектуального содержания, редактирование, утверждение окончательного варианта рукописи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. The authors declare that there are no obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.