

ЧАУСОВ Владимир Николаевич

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА ДНК НА ФОРМИРОВАНИЕ
ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ
ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ**

1.5.1. Радиобиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Обнинск – 2025

Работа выполнена в Международной межправительственной организации «Объединенный институт ядерных исследований».

Научный руководитель:

Борейко Алла Владимировна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Тахауов Равиль Манихович, доктор медицинских наук, профессор, директор Федерального государственного учреждения науки «Северский биофизический научный центр» Федерального медико-биологического агентства России;

Абдуллаев Серажутдин Абдуллаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Защита диссертации состоится « » _____ 2025 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.1.036.02 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации: по адресу 249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (249036, Калужская область, г. Обнинск, ул. Королева, д.4) и на сайте: <http://nmicr.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Минаева Наталья Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Проблема биологического действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками представляется одной из ключевых в радиационной биологии. Много лет тяжелые заряженные частицы привлекают внимание специалистов-радиобиологов как эффективный инструмент при решении фундаментальных вопросов, связанных с выяснением механизмов биологического действия ионизирующей радиации. На необходимость и плодотворность применения ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками в изучении механизмов генетического действия радиации указывали классики радиационной биологии (Григорьев Ю.Г. и др., 1971; Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И., Корогодин В.И., 1986; Wuskoff R.W.G., 1930). Результаты исследований биологических эффектов, вызываемых тяжелыми заряженными частицами, использовались ими при обосновании фундаментального методологического принципа радиобиологии – «принципа попадания и мишени». Последние десятилетия выдвинули ряд важных практических задач, решение которых требует детального изучения механизмов биологического действия тяжелых ионов различных энергий.

Одной из центральных задач радиационной биологии является выяснение характера повреждений ДНК, индуцируемых излучениями разного качества. Показано (Красавин Е.А., 1989; Goodhead D.T., 1994; Penninckx S. et al., 2021), что при действии ионизирующих излучений индуцируются разные по качеству и генезису повреждения ДНК.

Характер повреждений ДНК, образующихся при действии тяжелых заряженных частиц, существенно отличается от таковых при облучении γ -квантами. Ускоренные тяжелые ионы, в отличие от γ -квантов, индуцируют в ДНК повреждения преимущественно кластерного типа. Такие повреждения представляют собой комбинацию одномоментно возникающих нарушений участка ДНК, с образованием односторонних разрывов, модификацией оснований, двусторонних разрывов ДНК (Holley W.R., Chatterjee A., 1996; Matsuya Y. et al., 2020; Michalik V., 1992). События такого рода являются результатом локального выделения большого количества энергии при прохождении тяжелой заряженной частицы через молекулу ДНК.

Среди широкого спектра различных повреждений ДНК, формирующихся при действии ионизирующей радиации наиболее тяжелыми, приводящими к клеточной гибели, являются одновременные нарушения целостности двух нитей ДНК – двусторонние разрывы ДНК (ДР). ДР ДНК образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков – прямые ДР (ПДР), вследствие передачи энергии локальному участку ДНК и приводящему к нарушению её целостности, либо формируются из других повреждений как «издержки репарации» в процессе работы репарационных ферментов (Красавин Е.А., 1989; Malyarchuk S., Castore R., Harrison L., 2008; Penninckx S. et al., 2021). Этот тип повреждений относится к разряду энзиматических ДР (ЭДР). Хотя ключевая роль ДР ДНК в реализации важнейших биологических

эффектов облучения – гибели клеток, формировании мутаций, инициации канцерогенеза, давно известна, однако данные, касающиеся особенностей формирования и репарации различных типов ДР ДНК при действии ускоренных тяжелых ионов различных энергий весьма ограничены и часто противоречивы. Имеются существенные пробелы в вопросе вклада ЭДР в суммарный выход ДР ДНК, а также в эффективности и кинетики их репарации.

Ранее было показано (Филатов М.В., Носкин А.Н., Коношенко Н.В., 1983), что в условиях влияния некоторых агентов, блокирующих репаративный и репликативный синтез ДНК, наблюдается возрастание радиочувствительности клеток млекопитающих при действии гамма-квантов, однако их модифицирующее влияние резко снижается при облучении клеток ускоренными тяжёлыми ионами. Это обстоятельство может указывать на различия в характере формирования ДР ДНК, обуславливающих гибель клеток – вклад в реализацию летальных эффектов ЭДР и ПДР ДНК при действии излучений широкого диапазона линейной передачи энергии (ЛПЭ). Учитывая актуальность, научную и практическую значимость (решение проблем космической радиобиологии, применение пучков заряженных частиц в терапии рака) изучения особенностей формирования и репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений разного качества, а также неполноту сведений в данной области, нами выполнены исследования, направленные на изучение закономерностей индукции и репарации ДР ДНК в условиях модифицирующего действия ингибиторов репарации ДНК в клетках человека при действии разных видов ионизирующих излучений, в широком диапазоне ЛПЭ.

Цель исследования

Изучение закономерностей индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии редко- и плотноионизирующих излучений в широком диапазоне значений линейной передачи энергии (γ -кванты, ускоренные ионы углерода, бора и азота различных энергий) в условиях модифицирующего действия ингибиторов синтеза и репарации ДНК – арабинозид цитозина и гидроксимочевина.

Задачи исследования

1. Исследовать закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии ионизирующих излучений в широком диапазоне ЛПЭ.
2. Изучить модифицирующее влияние ингибиторов синтеза и репарации ДНК – арабинозид цитозина и гидроксимочевина на формирование и репарацию двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ.
3. Определить соотношение выхода энзиматических и прямых ДР ДНК в клетках человека при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые проведено сравнительное исследование формирования прямых и энзиматических двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови и фибробластах человека при действии ионизирующих излучений в широком диапазоне ЛПЭ (0,3 – 160 кЭВ/мкм; γ -квантов, ускоренных ионов ^{12}C , ^{11}B и ^{15}N) в нормальных условиях и в условиях влияния ингибиторов синтеза и репарации ДНК. Получены количественные данные о характере модифицирующего влияния арабинозид цитозина (АраЦ) и гидроксимочевина (ГМ) на выход ДР ДНК. Изучены закономерности репарации ДР ДНК при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками. Показано, что в условиях влияния ингибиторов репарации ДНК кинетика формирования двунитевых разрывов ДНК в клетках отражает суперпозицию двух разнонаправленных процессов. Один из них отражает формирование энзиматических ДР ДНК в ходе эксцизионной репарации из повреждений ДНК (однонитевых разрывов (ОР), модифицированных оснований, АП-сайтов), второй процесс связан с репарацией, формирующихся ДР ДНК.

Результаты выполненных исследований, наряду с фундаментальным характером полученных данных, представляются важными для решения ряда актуальных практических вопросов. Прежде всего, это касается решения проблем биологической эффективности ионизирующих излучений разного качества и задач, стоящих перед космической радиобиологией, использованием адронных пучков в терапевтических целях в клинике лучевой терапии, решения вопросов нормирования лучевых нагрузок на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений. Повышение суммарного выхода ДР ДНК в клетках при действии излучений с низкой ЛПЭ в условиях влияния АраЦ и ГМ, представляется перспективным при решении задач радиационной медицины. Проведение совместных с сотрудниками Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России исследований на опухолевых клетках в моделях *in vitro* и *in vivo* позволило получить патенты на изобретения: патент № 2774032 «Способ повышения эффективности действия ионизирующих излучений на меланому», патент № 2798733 «Способ повышения эффективности действия протонной терапии на стволовые клетки меланомы».

Методология и методы исследования

В работе были задействованы актуальные экспериментальные подходы. Анализ формирования и репарации ДР ДНК осуществляли посредством двух взаимодополняющих методов: метода ДНК-комет и метода иммуноцитохимического окрашивания клеток при помощи антител, специфичных к белкам, участвующим в процессах репарации ДР.

Метод ДНК-комет представляет собой высокочувствительный подход для детекции различных типов повреждений ДНК: однонитевых разрывов, двунитевых разрывов и модифицированных оснований в отдельных клетках. В

настоящее время данный метод получил широкое распространение в исследованиях, благодаря сочетанию технической простоты, высокой чувствительности и возможности адаптации к различным экспериментальным условиям (Lacaze E. et al., 2010). Данный метод используется в различных областях: от проверки генотоксичности химических веществ для оценки их безопасности до изучения механизмов повреждения и восстановления ДНК, а также от мониторинга состояния человека до исследований в области экогенотоксикологии.

Метод иммуноцитохимического анализа репарационных белков предоставляет возможность выявлять рост числа ДР ДНК при действии различных химических и физических факторов, в том числе ионизирующих излучений разного качества, а также изучать пространственное расположение белков репарации относительно ДР ДНК внутри ядра клетки. В диссертационной работе для определения ДР ДНК, индуцированных ионизирующим излучением, использовали моноклональные мышиные антитела к гистону γ H2AX и поликлональные кроличьи антитела к белку 53BP1 (Заднепрянец М.Г. и др., 2018; Чаусов В.Н. и др., 2018).

Облучение γ -квантами проводили на установке "Рокус-М" Медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Джелепова Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ), г. Дубна. Облучение клеток тяжёлыми заряженными частицами проводили на ускорителе тяжёлых ионов У-400М Лаборатории ядерных реакций им. академика Г.Н. Флёрова ОИЯИ на установке "Геном-М" с комплексом физико-дозиметрической аппаратуры, обеспечивавшей формирование пучка, определение ЛПЭ частиц и дозы облучения в биообъекте, автоматическую смену облучаемых образцов (Bezbakh A.A. et al., 2013), а также на ускорителе "Нуклотрон" Лаборатории физики высоких энергий им. академиков В.И. Векслера и А.М. Балдина ОИЯИ. Дозиметрию осуществляли, используя специально созданную установку с комплексом электронно-физической аппаратуры (Тимошенко Г.Н., 2005)

Основные положения, выносимые на защиту

1. При действии ионизирующих излучений формируются ДР ДНК разного генеза – прямые ДР ДНК и энзиматические ДР ДНК, соотношение которых изменяется с ростом ЛПЭ излучений: увеличивается выход прямых ДР ДНК и снижается выход энзиматических ДР ДНК.

2. При действии гамма-излучения в условиях влияния ингибиторов синтеза и репарации ДНК – арабинозид цитозина и гидроксимочевина, количество ДР ДНК резко возрастает, что обусловлено формированием дополнительного числа энзиматических ДР ДНК.

3. С ростом ЛПЭ излучений модифицирующее влияние ингибиторов синтеза и репарации ДНК – арабинозид цитозина и гидроксимочевина, снижается по сравнению с гамма-излучением, что связано с изменением спектра формируемых повреждений – увеличением количества прямых ДР

ДНК и снижением количества ОР ДНК и модифицированных оснований, которые являются субстратом для формирования энзиматических ДР ДНК.

4. Кинетика репарации ДР ДНК зависит как от физических характеристик излучений, так и от количества и скорости формирования энзиматических ДР ДНК.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных в ходе исследования результатов достигается необходимым и достаточным количеством наблюдений, соответствующих целям и задачам, поставленным в работе, а также актуальным и проверенным методам исследований, общепринятым в научном сообществе.

Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на 18 конференциях и симпозиумах: Международный симпозиум "Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики" (Ереван, 2007), VII, VIII, IX "Конференция молодых ученых, специалистов и студентов", посвященная дню космонавтики (Москва, 2008, 2009, 2010), Конференция «Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиоэкологии» (Москва-Дубна, 2008), Heavy Ions in Therapy and Space Symposium (Cologne, Germany, 2009), IV Сисакьяновские чтения "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии" (Алушта, Украина, 2010), VI Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность) (Москва, 2010), Круглый стол "Актуальные вопросы радиационной безопасности длительных космических полётов" (Дубна, 2011), 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA (Brno, Prague, Czech, 2012), Круглый стол "Актуальные проблемы общей и космической радиобиологии и астробиологии" (памяти академиков Н.М. Сисакьяна и А.Н. Сисакьяна) (Дубна, 2014), VII Съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиоэкология, радиационная безопасность), (Москва, 2014), Международная конференция "Современные направления в радиобиологии и астробиологии. Молекулярные, генетические, клеточные и тканевые эффекты" (Дубна, 2015), Международная конференция «Современные направления в радиобиологии и астробиологии», посвященная 60-летию ОИЯИ (Дубна, 2016), Международная конференция «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 2016), V ежегодная конференцию молодых ученых и специалистов «Алушта-2016» (Алушта, 2016), VIII Съезд по радиационным исследованиям (Москва, 2021), VII Международная научно-практическая конференция «Медицинские и экологические эффекты ионизирующего излучения» (Томск, 2023).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликованы 23 работы, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов

диссертационного исследования. Получен патент №2699670 «Способ повышения частоты образования двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии ионизирующих излучений в условиях влияния радиомодификаторов».

Личное участие автора в получении научных результатов

Основные научные результаты и выводы, содержащиеся в диссертации, получены автором самостоятельно. Автор диссертационной работы принимал непосредственное участие в планировании и организации работы, проводил все входящие в её состав экспериментальные исследования, осуществлял обработку полученных результатов, в том числе, статистическую, а также анализ и сопоставление с данными, имеющимися в литературе, подготавливал результаты работы к публикации в научных изданиях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 1.5.1. Радиобиология (биологические науки) и охватывает п. 4 «Механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками» и п. 6 «Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток» паспорта специальности.

Структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 124 страницах машинописного текста и включают 34 рисунка и 12 таблиц. Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список литературы», который содержит 220 ссылки, из них 204 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались лимфоциты периферической крови здорового донора, выразившего добровольное согласие на проведение этого исследования и нормальные фибробласты кожи человека. Для выявления степени поврежденности ДНК и определения выхода ДР ДНК в лимфоцитах был использован метод ДНК-комет с некоторыми модификациями (Борейко А.В. и др., 2011; Чаусов В.Н. и др., 2009). Для количественной оценки частоты образования ДР ДНК в отдельных ядрах клеток фибробластов и их визуализации при действии разных типов излучений в обычных условиях и в присутствии модифицирующих агентов был использован иммуноцитохимический метод определения γ H2AX/53BP1 фокусов (Заднепрянец М.Г. и др., 2018; Чаусов В.Н. и др., 2018).

Выделение лимфоцитов. Лимфоциты выделяли из свежей цельной крови, стабилизированной гепарином (концентрация 15 МЕ/мл). Кровь смешивали с равным объемом фосфатного буфера (ФБ, pH 7.4, Панэко, Россия). Полученную суспензию наслаивали на раствор фиколла (плотность 1.077 г/мл, «Панэко», Россия) и центрифугировали. После центрифугирования интерфазный слой, содержащий лимфоциты, аккуратно отбирали и дважды отмывали в ФБ путем центрифугирования. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI 1640 (Панэко, Россия), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки, до конечной концентрации 2×10^6 клеток/мл.

Клеточная культура. Нормальные фибробласты кожи человека линии NHDF 22873 (Lonza, Швейцария) культивировали в среде IMDM (Sigma-Aldrich, Германия), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, Германия) и 1% раствором гентамицин-глутамин (Sigma-Aldrich, Германия). Клетки выращивали в пластиковых флаконах с площадью поверхности роста 25 см² (Corning, США) в условиях 37 °C и 5% CO₂. Для экспериментов использовали клетки на 9–12-м пассаже.

За 16–18 часов до облучения 300 мкл клеточной суспензии наносили на покровные стекла диаметром 14 мм и толщиной 0,17 мм, размещенные в пластиковых чашках Петри диаметром 35 мм (MatTek Corporation, США). После 2-часовой инкубации, необходимой для прикрепления клеток, добавляли 3,5 мл культуральной среды.

За 1 час до облучения в суспензию лимфоцитов и культуральную среду фибробластов вносили АраЦ (Sigma-Aldrich, Германия) и ГМ (Sigma-Aldrich, Германия) в конечных концентрациях 20 мкМ и 2 мМ соответственно, и инкубировали в термостате при 37 °C.

Источники излучений и физическая аппаратура. Для решения поставленных задач в ходе исследований использовали γ -кванты ⁶⁰Со и ускоренные многозарядные ионы различных энергий. Диапазон значений ЛПЭ тяжелых заряженных частиц простирался от 0,3 кэВ/мкм до 160 кэВ/мкм. Физические характеристики использованных излучений представлены в таблице 1.

Облучение γ -квантами проводили на установке "Рокус-М" Медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Джелепова Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ). Облучение клеток тяжёлыми заряженными частицами проводили на ускорителе тяжёлых ионов У-400М Лаборатории ядерных реакций им. академика Г.Н. Флёрова ОИЯИ на установке "Геном-М" с комплексом физико-дозиметрической аппаратуры, обеспечивавшей формирование пучка, определение ЛПЭ частиц и дозы облучения в биообъекте, автоматическую смену облучаемых образцов (BezbaKh A.A. et al., 2013), а также на ускорителе "Нуклотрон" Лаборатории физики высоких энергий им. академиков В.И. Векслера и А.М. Балдина ОИЯИ. Дозиметрию осуществляли, используя специально созданную установку с комплексом электронно-физической аппаратуры (Тимошенко Г.Н., 2005).

Таблица 1 – Физические характеристики использованных в экспериментах излучений

Частицы	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм	Мощность дозы, Гр/мин	Установка
^{12}C	480	10,3	~0,3	Нуклотрон
^{11}B	33,4	44	~15	У-400М
^{15}N	43	70	~10	У-400М
^{11}B	14	89	~15	У-400М
^{11}B	9	127	~15	У-400М
^{15}N	15	160	~10	У-400М
γ -кванты ^{60}Co	-	0,3	1,2	Рокус-М

Облучение лимфоцитов. Облучение суспензии лимфоцитов проводили на установке «Рокус-М» и ускорителе «Нуклотрон» с использованием микропробирок объемом 0,5–1,5 мл (Eppendorf, Германия). Для минимизации процессов репарации во время облучения образцы помещали в ледяную баню (температура 0–4 °С).

Для облучения на ускорителе У-400М использовали специально разработанные чашки из органического стекла глубиной 4 мм и внутренним диаметром 12 мм. Чашки закрывали поликарбонатной пленкой толщиной 8 мкм. Размеры чашек были выбраны с учетом диаметра пучка ионов (15 мм) и пробега частиц в облучаемой среде. Для исключения краевых эффектов диаметр чашек был меньше размера пучка. Чашки с пробами лимфоцитов фиксировали в диске-контейнере, который автоматически вводил образцы в зону облучения по заданной программе.

Перед и после облучения на установках У-400М и «Рокус-М» все образцы с суспензией лимфоцитов хранились в термоконтейнере при температуре 4 °С для подавления репарационных процессов. Объем облучаемой суспензии для каждой дозы составлял 200 мкл. После облучения из суспензии отбирали необходимые объемы для приготовления слайдов, а оставшуюся часть инкубировали в CO_2 -термостате при 37 °С.

Для анализа кинетики репарации пробы отбирали каждые 2 часа в течение 6 часов инкубации в термостате и использовали для приготовления слайдов.

Облучение фибробластов. Фибробласты кожи человека облучали γ -квантами источника ^{60}Co на установке для дистанционной лучевой терапии «Рокус-М» (Лаборатория ядерных проблем им. В.П. Джелепова ОИЯИ). Мощность дозы составляла 0,8 Гр/мин при расстоянии от источника до поверхности образца 75 см.

Эксперименты с ускоренными ионами ^{15}N (ЛПЭ = 85 кэВ/мкм, энергия = 33 МэВ/нуклон) проводили на установке «Геном-М» циклотрона У-400М (Лаборатория ядерных реакций им. Г.Н. Флерова ОИЯИ). Чашки Петри фиксировали на поворотном барабане, обеспечивая перпендикулярное

пересечение пучком частиц предметного стекла и монослоя клеток без потерь энергии. Мощность дозы при облучении ионами составляла ~2 Гр/мин.

Поглощенная доза в образцах измерялась с помощью тонкой проходной ионизационной камеры. Неоднородность поля облучения не превышала 5% в пределах площади стекла с клетками (14 мм²) для установки «Геном-М» и в пределах площади образца для установки «Рокус-М».

Метод ДНК-комет. Суспензию клеток смешивали при 37 °С с 1% раствором легкоплавкой агарозы (Sigma-Aldrich, Германия) в соотношении 1:5. На предварительно подготовленные слайды наносили 60 мкл полученной смеси, покрывали покровным стеклом (24 × 24 мм) и инкубировали в холодильнике в течение 5 минут для затвердевания. После этого покровное стекло осторожно удаляли.

Слайды переносили в емкость с лизирующим раствором (2,5 М NaCl; 0,1 М ЭДТА, рН 10; 0,02 М Трис, рН 10; 1% Triton X-100; 10% ДМСО), размещенную в холодильнике, и проводили лизис в течение 12–14 часов.

Электрофорез выполняли в нейтральных условиях при напряжении 0,5 В/см в течение 40 минут в низкосолевого ТАЕ-буфере (рН 8,3; Панэко, Россия). После электрофореза слайды нейтрализовали 0,4 М раствором Трис (рН 7,4; Панэко, Россия), нанося по 1,0 мл на каждый слайд. Процедуру нейтрализации повторяли трижды.

Слайды высушивали на воздухе до появления сеточки кристаллов на поверхности, после чего фиксировали ДНК, помещая их в метанол на 15 минут при комнатной температуре.

Для визуализации ДНК слайды окрашивали йодистым пропидием (6 мкг/мл). Изображения комет регистрировали с использованием флуоресцентного микроскопа Axiolab A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективом EC Plan-Neofluar 40×/0,75 M27 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой CCD-камерой AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). С каждого слайда анализировали 100–200 комет.

Обработку изображений комет проводили с помощью программы CASP (Коңса К. et al., 2003). Каждую комету характеризовали параметром момента хвоста (*mt*), который рассчитывали как произведение доли ДНК в хвосте (*Fm*) на его медиану (*Xm*) (Тронов В.А., Пелевина И.И., 1996).

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ. Через заданные временные интервалы после облучения (от 5 минут до 24 часов) клетки дважды промывали фосфатным буфером (ФБ, Gibco, США) и фиксировали 4% раствором параформальдегида, приготовленным в ФБ. После фиксации препараты отмывали при комнатной температуре. Для детекции маркеров двунитевых разрывов ДНК (γ H2AX и 53BP1) использовались специфичные первичные и вторичные антитела. В качестве первичных антител применяли моноклональные мышинные антитела против белка γ H2AX (ab22551, Abcam, США, разведение 1:700) и поликлональные кроличьи антитела против белка 53BP1 (ab21083, Abcam, США, разведение 1:600). Вторичные антитела включали поликлональные козы антитела против мышинных

иммуноглобулинов, конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC, ab97239, Abcam, США, разведение 1:200), и поликлональные козы анти тела против кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированные с Texas Red (ab6719, Abcam, США, разведение 1:400). Для визуализации ядер клеток использовали 600 нМ раствор 4',6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорида (DAPI, Sigma-Aldrich, Германия) в буфере для микроскопии Vectashield (Vector Laboratories, США).

Флуоресцентные изображения ядер фибробластов получали с использованием микроскопа AxioImager.M2, оснащенного системой оптического секционирования ApoTome.2 и монохромной цифровой камерой AxioCam MRm r.3.1 (Carl Zeiss, Германия). Для микроскопии применяли объектив EC Plan-Neofluar 100×/1.3 Oil Ph3/0.17 (Carl Zeiss, Германия), обеспечивающий увеличение в 1000 раз. Анализ трехмерных изображений проводился с использованием программного обеспечения Acqurarium (Kozubek M. et al., 2004), позволяющего идентифицировать отдельные фокусы γ H2AX и 53BP1 в срезах ядер в плоскостях XY, XZ и YZ. Количественная оценка колокализованных фокусов γ H2AX/53BP1 выполнялась тремя независимыми операторами вручную на основе анализа приблизительно 100 клеток каждого образца.

Статистический анализ полученных результатов. Статистический и регрессионный анализ данных проводили с использованием пакета GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Результаты представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка ($\pm$ SE) на основе 3 независимых экспериментов. Для определения момента хвоста (*mt*) анализировали не менее 2 слайдов по 100–120 клеток на каждый образец. Для определения количества γ H2AX/53BP1-фокусов оценивали не менее 100 клеток с 2 чашек Петри на дозу облучения. Для оценки значимости различий межгрупповых данных использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. Статистическая значимость была установлена при $p < 0,05$. Для графического представления результатов использовали программу OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При действии ионизирующих излучений в ДНК клеток формируется широкий спектр повреждений различного типа. Наиболее тяжёлыми нарушениями генетических структур, приводящими к клеточной гибели, формированию поломок хромосом, инициации злокачественной трансформации клеток являются одновременные нарушения целостности двух нитей ДНК – двунитевые разрывы (Jackson S.P., Bartek J., 2009; Sachs R.K., Chen A.M., Brenner D.J., 1997). Двунитевые разрывы образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков – прямые ДР, вследствие передачи энергии локальному участку ДНК, приводящее к нарушению её целостности, либо могут формироваться из других повреждений в процессе клеточного восстановления как «издержки репарации» в процессе

работы репарационных ферментов – энзиматические ДР (Kowalczykowski S.C., 2000; Yokoуа A. et al., 2009). При действии излучений с возрастающими величинами линейных передач энергии наблюдаются изменения в спектре индуцируемых повреждений ДНК клеток.

Центральной задачей настоящего исследования являлось определение соотношения выхода ДР ДНК при действии излучении широкого диапазона ЛПЭ в условиях влияния ингибиторов репарационного синтеза. В качестве модификаторов были использованы АраЦ и ГМ, блокирующие репарацию ОР ДНК. Было установлено, что ингибиторы оказывают больший модифицирующий эффект при действии излучений фотонной природы, чем при действии ускоренных заряженных частиц. Это может являться свидетельством того, что генезис формируемых ДР ДНК при γ -облучении и при действии тяжелых ионов различен. Как известно с ростом ЛПЭ излучений изменяется спектр индуцируемых повреждений ДНК: уменьшается количество ОР ДНК и возрастает количество прямых ДР ДНК. Как было отмечено ранее (Филатов М.В., Носкин А.Н., Коношенко Н.В., 1983) при действии γ -квантов ДР ДНК формируются из длительно нерепарируемых ОР ДНК вследствие блокирования ДНК-полимеразной активности на таких сайтах и атаки оппозитных нитей эндонуклеазами типа S_1 (Harrison L., Malyarchuk S., 2002; Rydberg B., 2000; Weinfeld M. et al., 2001).

Влияние ЛПЭ ионизирующих излучений на выход ДР ДНК

На рисунке 1 представлены зависимости момента хвоста, отражающего уровень индукции ДР ДНК, от дозы облучения γ -квантами и ускоренными ионами ^{12}C , ^{11}B и ^{15}N в лимфоцитах человека. Для всех видов использованных в экспериментах излучений, наблюдается линейный выход ДР ДНК.

На основании полученных результатов были рассчитаны величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) ускоренных ионов по критерию индукции ДР, определяемые как

$$\text{ОБЭ} = k_{\gamma}/k_{\text{ионы}},$$

где $k_{\gamma}/k_{\text{ионы}}$ есть отношение параметров углов наклона зависимостей «доза-эффект» при γ -облучении и при действии ускоренных тяжёлых ионов. Для ускоренных ионов ^{12}C с ЛПЭ = 10,2 кэВ/мкм, значения ОБЭ было близко к 1, для ионов ^{11}B с ЛПЭ 44 кэВ/мкм, 89 кэВ/мкм и 127 кэВ/мкм значения ОБЭ составили 1,33, 1,59 и 1,66, соответственно, а для ионов ^{15}N с ЛПЭ = 70 кэВ/мкм и 160 кэВ/мкм 1,44 и 1,84 соответственно (Таблица 2).

Как видно, с ростом ЛПЭ тяжелых заряженных частиц возрастает и количество ДР ДНК. И хотя для ионов ^{12}C , количество формируемых ДР ДНК примерно равно количеству повреждений, формируемых при облучении гамма-квантами, увеличение ЛПЭ заряженных частиц до 44 кэВ/мкм приводит к резкому росту выхода ДР ДНК (примерно на 33%) и достигает максимума при действии частиц с ЛПЭ 160 кэВ/мкм (увеличивается на 84%). При этом рост количества ДР ДНК в ряду изучаемых частиц с ЛПЭ от 44 кэВ/мкм до 160 кэВ/мкм не такой резкий и составляет 8% между частицами с ЛПЭ 44 кэВ/мкм

и 70 кэВ/мкм, 10% между 70 кэВ/мкм и 89 кэВ/мкм, 4% между 89 кэВ/мкм и 127 кэВ/мкм и 11% между 127 кэВ/мкм и 160 кэВ/мкм.

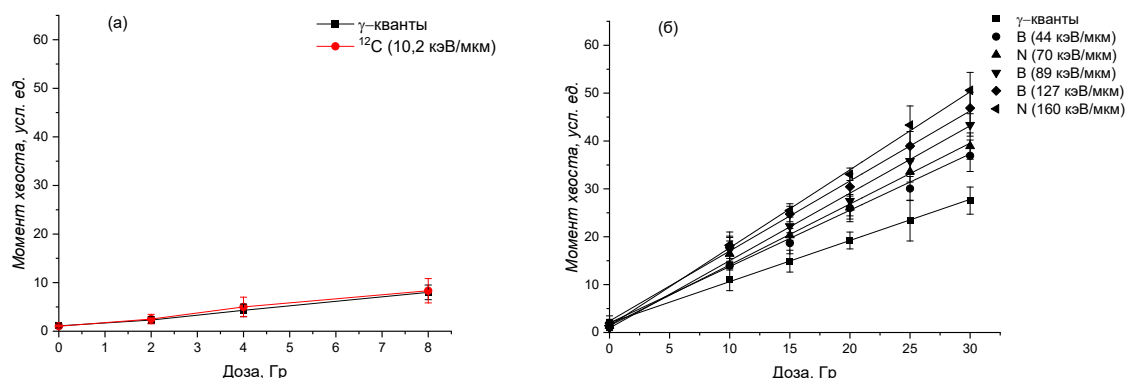


Рисунок 1 – Зависимость момента хвоста (mt) от дозы облучения γ -квантами и ускоренными ионами ^{12}C (а), ^{11}B и ^{15}N с разными значениями ЛПЭ (б) в лимфоцитах человека. Результаты исследований представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка ($\pm\text{SE}$) от 3 независимых экспериментов. Статистически значимых различий ($p < 0,05$) между γ -квантами и ионами ^{12}C не выявлено для всех доз облучения. Статистически значимые различия ($p < 0,05$) выявлены для всех пар, кроме ^{11}B (44 кэВ/мкм)/ ^{15}N (70 кэВ/мкм) – 10 Гр и 30 Гр, ^{15}N (70 кэВ/мкм)/ ^{11}B (89 кэВ/мкм) – 25 Гр, ^{11}B (89 кэВ/мкм)/ ^{11}B (127 кэВ/мкм) – 25 Гр. При последующем сравнении с ионами с большей ЛПЭ наблюдаются статистически значимые различия. Также не выявлены статистически значимые различия для всех доз облучения в паре ^{11}B (127 кэВ/мкм)/ ^{15}N (160 кэВ/мкм).

Таблица 2 – Значения ОБЭ для тяжелых ускоренных частиц с разной ЛПЭ

Частицы	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм	ОБЭ
^{12}C	480	10,3	$1,06 \pm 0,08$
^{11}B	33,4	44	$1,33 \pm 0,08$
^{15}N	43	70	$1,44 \pm 0,09$
^{11}B	14	89	$1,59 \pm 0,10$
^{11}B	9	127	$1,66 \pm 0,10$
^{15}N	15	160	$1,84 \pm 0,11$

Индукция ДР ДНК в условиях влияния АраЦ и ГМ

На рисунке 2 приведены зависимости момента хвоста от дозы облучения γ -квантами и ускоренными ионами бора и азота с разными значениями ЛПЭ в лимфоцитах человека сразу после облучения в нормальных условиях и в присутствии АраЦ и ГМ. Как видно, линейный характер кривых «доза-эффект» сохраняется как для нормальных условий, так и при облучении образцов в условиях действия ингибиторов репарации ДНК.

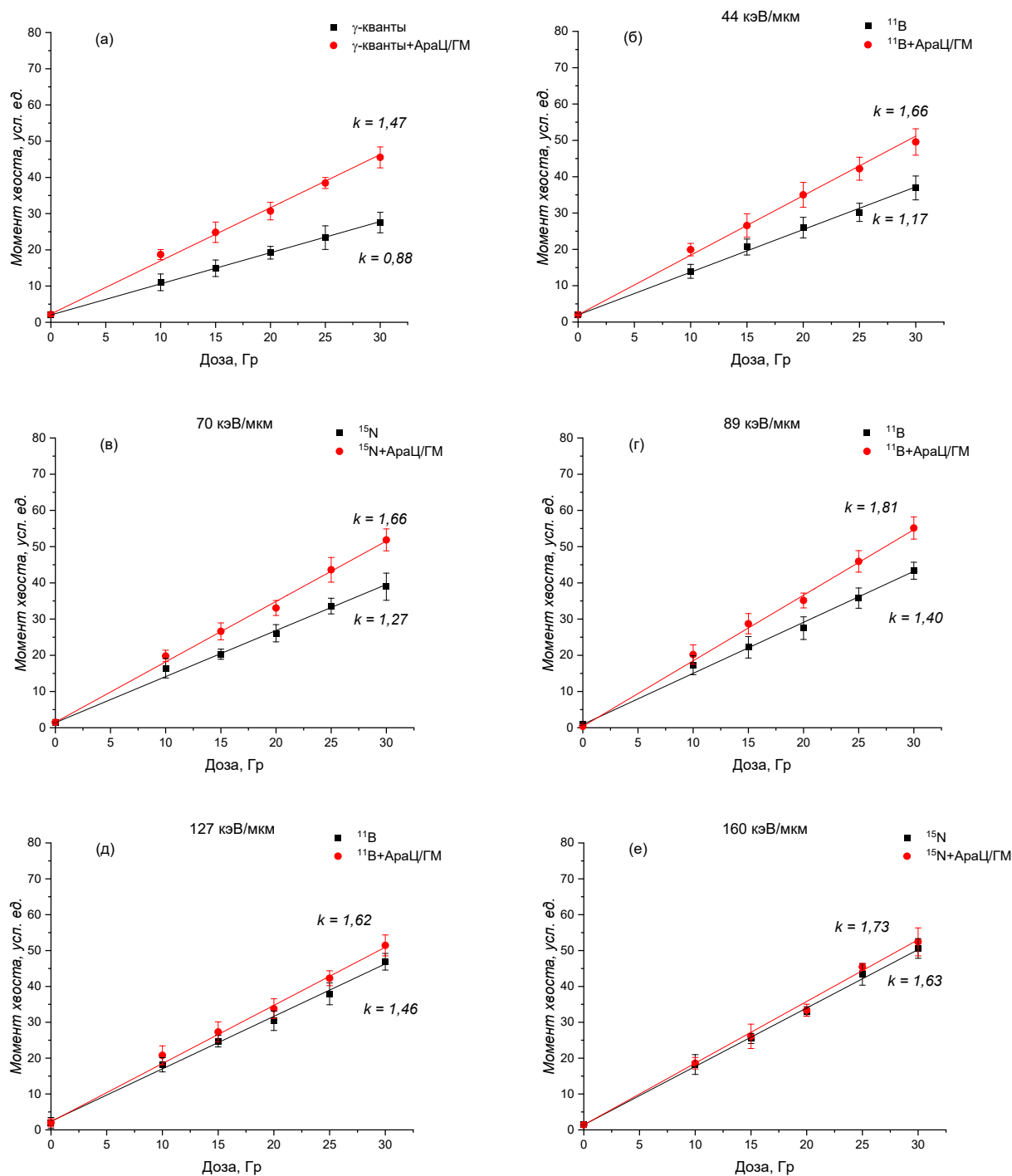


Рисунок 2 – Модифицирующее действие АраЦ и ГМ на индукцию ДР ДНК в лимфоцитах человека при действии ускоренных ионов ^{11}B и ^{15}N с разной ЛПЭ. Результаты исследований представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка ($\pm\text{SE}$) от 3 независимых экспериментов. Для γ -квантов и ускоренных ионов с ЛПЭ от 44 кэВ/мкм до 127 кэВ/мкм были установлены статистически значимые различия для всех значений доз облучения ($p < 0,05$). Для ионов ^{15}N с ЛПЭ = 160 кэВ/мкм статистически значимых различий для всех значений доз облучения установлено не было.

При этом с увеличением ЛПЭ частиц наблюдается снижение модифицирующего влияния ингибиторов репарации на выход ДР ДНК, что отражается на значении коэффициента k (Таблицы 3-8), характеризующего

величину наклона зависимости «доза-эффект», а также при анализе величины фактора изменения дозы (ФИД), определяемой как

$$\text{ФИД} = k_{\text{мод}}/k_{\text{норм}},$$

где $k_{\text{мод}}$ и $k_{\text{норм}}$ – параметры наклона зависимостей «доза-эффект» при действии радиомодификаторов и в нормальных условиях инкубации, соответственно.

Таблица 3 – Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения γ -квантами

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой (k)		ФИД
	нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$0,88 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,04$	$1,67 \pm 0,10$
2	$0,38 \pm 0,02$	$1,76 \pm 0,04$	$4,66 \pm 0,57$
4	$0,24 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,03$	$8,62 \pm 3,01$
6	$0,19 \pm 0,02$	$2,38 \pm 0,1$	$12,36 \pm 3,47$

Таблица 4 – Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{11}B 44 кэВ/мкм

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой (k)		ФИД
	нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,17 \pm 0,03$	$1,66 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,04$
2	$0,47 \pm 0,02$	$1,63 \pm 0,02$	$3,48 \pm 0,14$
4	$0,29 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,06$	$5,88 \pm 2,44$
6	$0,23 \pm 0,05$	$1,78 \pm 0,09$	$7,77 \pm 2,81$

Таблица 5 – Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{15}N 70 кэВ/мкм

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой (k)		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,27 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,05$
2	$0,48 \pm 0,02$	$1,59 \pm 0,03$	$3,27 \pm 0,14$
4	$0,40 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,02$	$4,02 \pm 0,43$
6	$0,31 \pm 0,02$	$1,69 \pm 0,02$	$5,46 \pm 0,34$

Таблица 6 – Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{11}B 89 кэВ/мкм

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой (k)		ФИД
	нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,40 \pm 0,03$	$1,81 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$
2	$0,59 \pm 0,16$	$1,65 \pm 0,04$	$2,83 \pm 0,71$
4	$0,45 \pm 0,02$	$1,58 \pm 0,03$	$3,51 \pm 0,21$
6	$0,38 \pm 0,02$	$1,56 \pm 0,05$	$4,07 \pm 0,27$

Таблица 7 – Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{11}B 127 кэВ/мкм

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой (k)		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,46 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,04$
2	$0,64 \pm 0,05$	$0,73 \pm 0,06$	$1,15 \pm 0,14$
4	$0,53 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,06$
6	$0,44 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,15$

Таблица 8 – Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{15}N 160 кэВ/мкм

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой (k)		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,63 \pm 0,03$	$1,73 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,03$
2	$0,67 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,08$
4	$0,58 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,04$	$1,04 \pm 0,08$
6	$0,50 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,03$	$1,07 \pm 0,09$

Таблица 9 – Значения ФИД после облучения γ -квантами и ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N с разными значениями ЛПЭ

Время после облучения, ч	γ -кванты	^{11}B 44 кэВ/мкм	^{15}N 70 кэВ/мкм	^{11}B 89 кэВ/мкм	^{11}B 127 кэВ/мкм	^{15}N 160 кэВ/мкм
0	$1,67 \pm 0,10$	$1,41 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,05$	$1,29 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,03$
2	$4,66 \pm 0,57$	$3,48 \pm 0,14$	$3,27 \pm 0,14$	$2,83 \pm 0,71$	$1,15 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,08$
4	$8,62 \pm 3,01$	$5,76 \pm 2,44$	$4,02 \pm 0,43$	$3,51 \pm 0,21$	$1,16 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,09$
6	$12,36 \pm 3,47$	$7,77 \pm 2,81$	$5,46 \pm 0,34$	$4,07 \pm 0,27$	$1,25 \pm 0,15$	$1,07 \pm 0,09$

Значения ФИД, определяемые непосредственно после облучения имеют величину от $1,67 \pm 0,10$ для γ -квантов до $1,06 \pm 0,09$ для ионов ^{15}N с ЛПЭ, равной 160 кэВ/мкм (Таблица 9). Подобное снижение значений ФИД обнаружено и для других периодов пострадиационной инкубации клеток. Интересным представляются изменения ФИД внутри одного значения ЛПЭ частиц с течением времени инкубации. Как для γ -квантов, так и для ускоренных ионов наблюдается возрастание этого параметра. Однако, наиболее резкий рост выявлен для γ -квантов с 1,67 до 12,36 (возрастает более чем в 6 раз). С увеличением ЛПЭ частиц происходит постепенное снижение роста значений ФИД, и уже при достижении ЛПЭ = 127 кэВ/мкм наблюдается рост всего на 13%, а для частиц с ЛПЭ = 160 кэВ/мкм на 1%.

Влияние АраЦ и ГМ на кинетику репарация ДР ДНК

Линейный характер кривых «доза-эффект» сохраняется для всех условий облучения и в остальные интервалы пострadiaционного периода (2, 4, 6 ч). Следует заметить наличие изменений в значениях параметра k в течение этого периода. Так, при облучении в нормальных условиях при действии γ -квантов наблюдается снижение параметра k примерно в 4 раза (с $0,88 \pm 0,05$ до $0,19 \pm 0,02$), а для ускоренных ионов бора и азота в 3 – 5 раз (Таблицы 3-8).

Как видно, в условиях влияния ингибиторов АраЦ и ГМ наблюдается резкое увеличение выхода ДР ДНК при действии γ -квантов в течение всего периода пострadiaционной инкубации клеток. Значение параметра $k = 1,47 \pm 0,04$, определяемое непосредственно после облучения, возрастает до $2,38 \pm 0,10$ через 6 ч пострadiaционной инкубации клеток.

Модифицирующее влияние АраЦ и ГМ при облучении ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N на индукцию ДР ДНК снижается с ростом ЛПЭ частиц. Так, для ионов бора с ЛПЭ = 44 кэВ/мкм в пострadiaционный период наблюдается увеличение количества ДР ДНК. Значения параметра k в этом случае возрастают с $1,66 \pm 0,04$ до $1,78 \pm 0,09$ (Таблица 4). Для ускоренных ионов азота с ЛПЭ, равными 70 кэВ/мкм (Таблица 5), значения параметра k сохраняется примерно на одинаковом уровне, и составляют $\sim 1,62$. При более высоких ЛПЭ частиц (ионы ^{11}B , 89 кэВ/мкм) в пострadiaционный период наблюдается незначительное уменьшение количества ДР ДНК (Таблица 6). Значения параметра k снижаются с $1,81 \pm 0,06$ при определении непосредственно после облучения до $1,56 \pm 0,05$ через 6 ч инкубации.

Для ионов ^{11}B и ^{15}N с ЛПЭ, соответственно равным 127 кэВ/мкм и 160 кэВ/мкм, изменения параметра k примерно одинаковы и близки к значениям, полученным в условиях отсутствия модификаторов (Таблицы 7, 8). Отличия заключаются лишь в том, что остаточное количество ДР ДНК в условиях влияния ингибиторов незначительно выше уровня ДР ДНК, наблюдаемых в нормальных условиях.

При анализе показателей ФИД, рассчитанных для излучений с разными физическими характеристиками и отражающими величину модифицирующего влияния использованных модификаторов на выход ДР ДНК (Таблица 9), отчетливо видны их высокие значения в пострadiaционный период при γ -облучении (~ 12 через 6 ч). В то же время значения ФИД уменьшаются с ростом ЛПЭ излучений, и для ионов ^{11}B и ^{15}N с высокими величинами ЛПЭ (127 и 160 кэВ/мкм) модифицирующее влияние АраЦ и ГМ на выход ДР ДНК практически отсутствует. При этом следует отметить, что для частиц с ЛПЭ выше 120 кэВ/мкм наблюдается возрастание значений ФИД.

Изучено модифицирующее влияние АраЦ и ГМ на кинетику репарации ДР ДНК при облучении γ -квантами и ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N в дозах 20 Гр (рис. 3), 25 Гр и 30 Гр. Как при γ -облучении, так и при действии ускоренных тяжёлых ионов с различной величиной ЛПЭ репарация ДР ДНК осуществляется по экспоненциальной кинетике, что подтверждается

проведенным регрессионным анализом методом однофазного экспоненциального затухания ($R^2=0,99$).

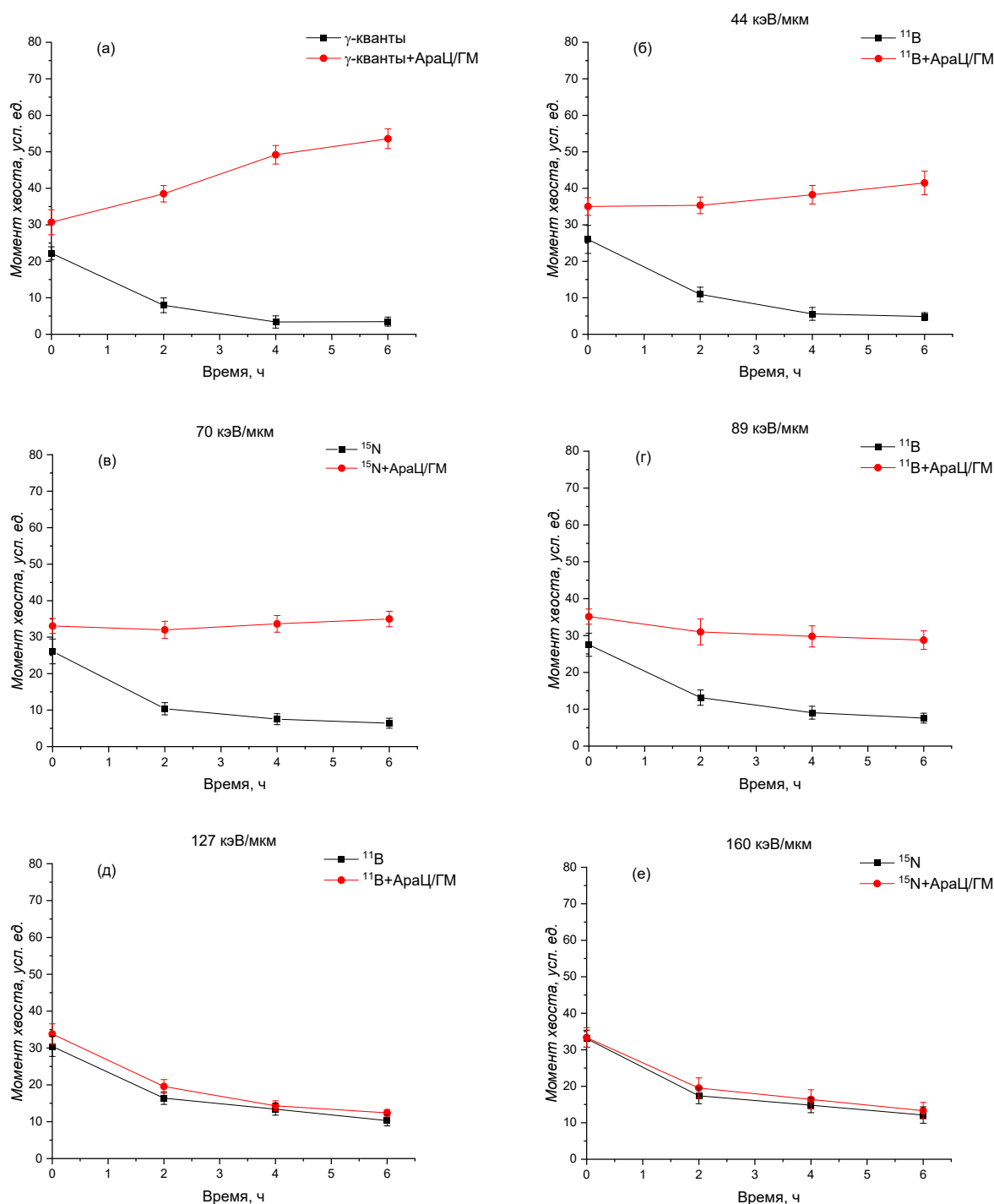


Рисунок 3 – Модифицирующее влияние АраЦ и ГМ на кинетику репарации ДР ДНК в лимфоцитах человека при действии ускоренных ионов ^{11}B в дозе 20 Гр. Результаты исследований представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка ($\pm\text{SE}$) от 3 независимых экспериментов. Статистически значимых различий ($p<0,05$) не выявлено для всех временных интервалов для ионов ^{15}N (ЛПЭ=160 кэВ/мкм).

Следует заметить, что остаточное количество неотрепарированных повреждений увеличивается с ростом ЛПЭ частиц (рис. 4).

Однако, кинетика репарации ДР ДНК при облучении тяжелыми ионами в присутствии модификаторов АраЦ и ГМ изменяется с ростом ЛПЭ излучений. Так, при γ -облучении наблюдается не снижение количества индуцируемых ДР ДНК, а, наоборот, их значительное возрастание. Небольшое увеличение момента хвоста со временем инкубации клеток отмечается и при действии ускоренных ионов бора с ЛПЭ = 44 кэВ/мкм. Практически неизменным со временем остается количество ДР ДНК при облучении ионами бора с ЛПЭ = 89 кэВ/мкм и ионами азота с ЛПЭ = 70 кэВ/мкм. Однако при действии частиц с высокими значениями ЛПЭ: ионами бора с ЛПЭ = 127 кэВ/мкм и азота с ЛПЭ = 160 кэВ/мкм кинетика репарации в условиях влияния радиомодификаторов близка к таковой, как и при облучении без модификаторов. При этом для ионов бора с ЛПЭ = 127 кэВ/мкм наблюдаются все еще статистически значимые ($p < 0,05$) различия в уровне ДР ДНК как в условиях влияния модификаторов, так и без них. Для ионов азота с ЛПЭ = 160 кэВ/мкм таких различий не наблюдается.

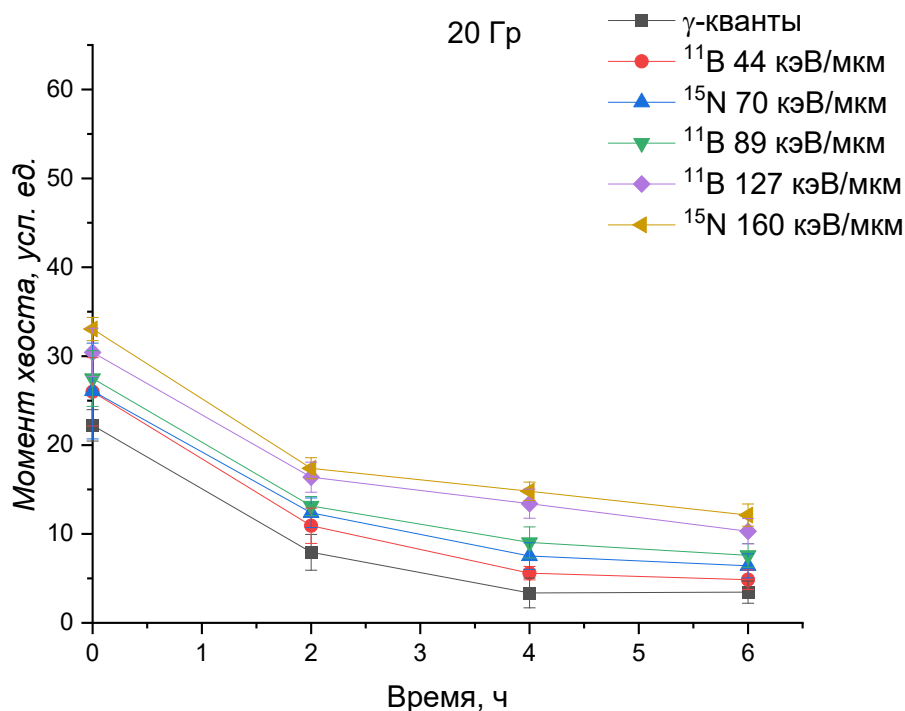


Рисунок 4 – Кинетика репарации ДР ДНК в лимфоцитах человека при облучении γ -квантами и ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N в дозе 20 Гр в нормальных условиях. Результаты исследований представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка ($\pm\text{SE}$) от 3 независимых экспериментов. Не выявлены статистически значимые различия ($p < 0,05$) для пары ^{15}N (70 кэВ/мкм)/ ^{11}B (89 кэВ/мкм) – 2 ч.

Иммуноцитохимический анализ индукции и репарации ДР ДНК при действии γ -квантов и ускоренных тяжёлых ионов в условиях модифицирующего действия АраЦ и ГМ

Для количественной оценки частоты образования ДР ДНК в отдельных ядрах клеток и их визуализации при действии разных типов излучений в

присутствии модифицирующих агентов был использован иммуноцитохимический метод визуализации γ H2AX/53BP1 фокусов.

Изображение индивидуальных γ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах фибробластов человека через 4 ч при облучении γ -квантами и ускоренными ионами азота с ЛПЭ = 85 кэВ/мкм ($E = 33$ МэВ/нуклон) в дозе 1,25 Гр в присутствии радиомодификаторов представлены на рисунке 5. Хорошо видно, что количество радиационно-индуцированных фокусов (РИФ) в пострadiационный период после γ -облучения в условиях влияния АраЦ и ГМ резко возрастает. Сходная картина наблюдается и при облучении ускоренными ионами азота, однако, количество РИФ в этом случае меньше по сравнению с клетками облученными γ -квантами.

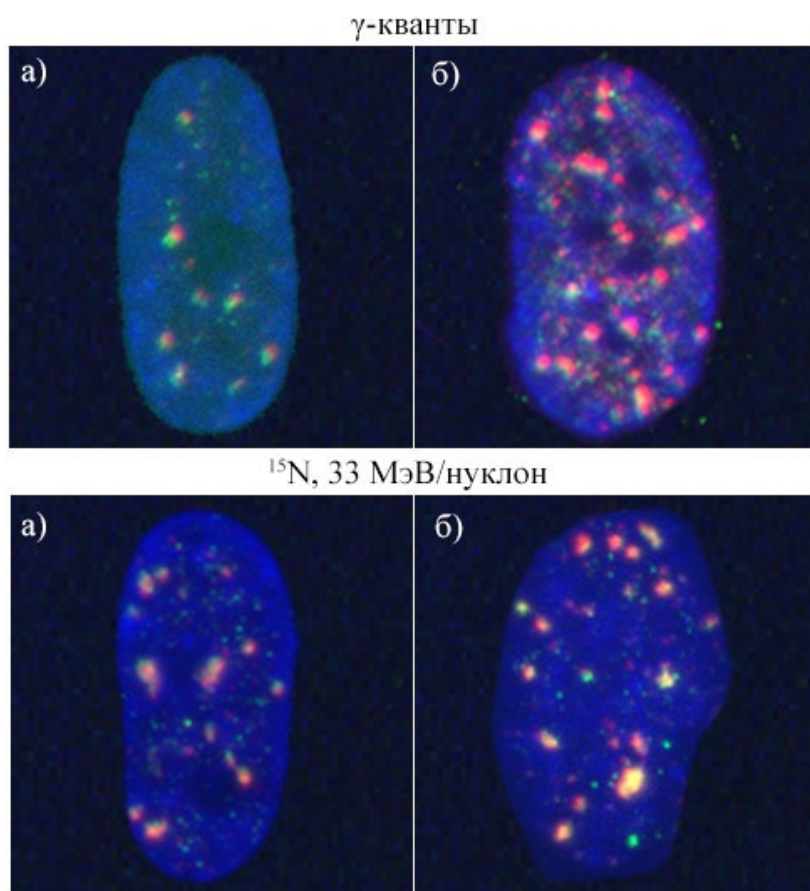


Рисунок 5 – Изображение индивидуальных γ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах фибробластов человека через 4 ч при действии γ -квантов и ускоренных ионов азота ЛПЭ = 85 кэВ/мкм ($E = 33$ МэВ/нуклон). Облучение γ -квантами дозой 1 Гр и ускоренными ионами азота дозой 1,25 Гр в нормальных условиях (а) и в присутствии АраЦ и ГМ (б).

Результаты количественного анализа формирования РИФ в ядрах фибробластов в условиях модифицирующего влияния АраЦ и ГМ при облучении γ -квантами и тяжёлыми заряженными частицами представлены на рисунке 6, соответственно. Как можно видеть, при облучении клеток в нормальных условиях количество РИФ возрастает через 1 ч после лучевого воздействия, а затем уменьшается по экспоненциальной кинетике. К 24 ч

пострадиационной инкубации клеток процессы репарации ДР ДНК практически полностью завершаются.

В условиях влияния АраЦ и ГМ наблюдается резкое возрастание количества РИФ, вплоть до 8 ч пострadiационной инкубации клеток, а затем происходит снижение количества РИФ к 24 ч пострadiационной инкубации. При этом количество неотрепарированных РИФ в условиях влияния ингибиторов репарации превышает уровень РИФ в нормальных условиях в 8,4 раза. Близкая картина наблюдается и при облучении клеток ускоренными ионами ^{15}N с ЛПЭ равной 85 кэВ/мкм. И хотя, сенсibiliзирующий эффект ингибиторов репарации по сравнению с облучением γ -квантами существенно меньший, уровень РИФ через 24 ч пострadiационной инкубации в условиях влияния АраЦ и ГМ в 3 раза выше уровня РИФ при γ -облучении. Данные о модифицирующем влиянии АраЦ и ГМ на формирование генетических нарушений, полученные методом ДНК-комет (Таблица 6; рис. 3г) и иммуноцитохимическим методом указывают на близкий характер закономерностей образования ДР ДНК в этих условиях при действии частиц с ЛПЭ $\sim 70 - 90$ кэВ/мкм.

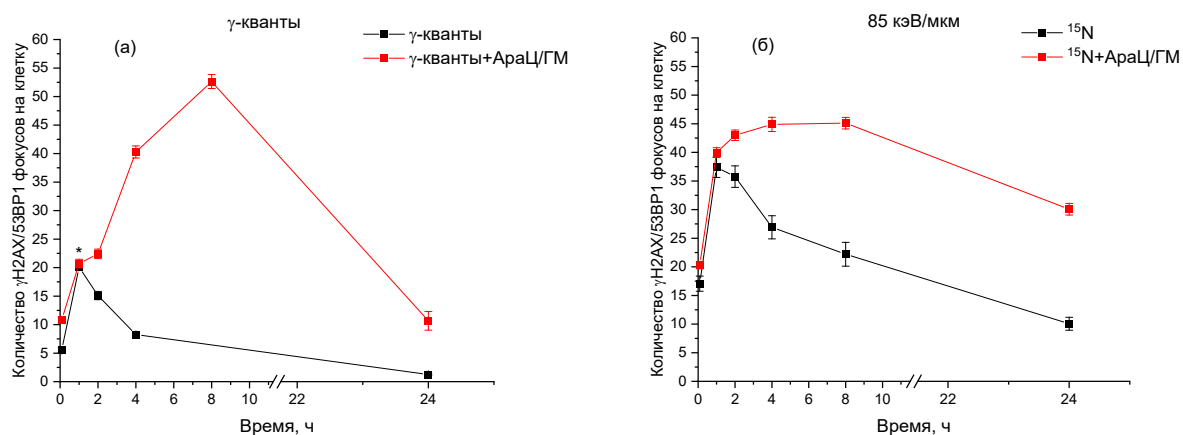


Рисунок 6 – Кинетика формирования и элиминации фокусов $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ в ядрах фибробластов человека при действии γ -квантов (а) в дозе 1 Гр и ускоренных ионов ^{15}N с ЛПЭ = 85 кэВ/мкм ($E = 33$ МэВ/нуклон) в дозе 1,25 Гр в нормальных условиях и в присутствии АраЦ и ГМ. Результаты исследований представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка ($\pm\text{SE}$) от 3 независимых экспериментов. (*) – статистически значимые различия не установлены ($p < 0,05$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии ионизирующих излучений электромагнитной природы с малой величиной ЛПЭ и ускоренных заряженных частиц с высокими ЛПЭ, в генетических структурах клеток могут формироваться двунитевые разрывы ДНК различного генеза. Такие нарушения образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков – прямые ДР, либо могут формироваться из других повреждений – одностранных разрывов прямого типа и ОР, образующихся в ходе эксцизионной репарации. Использование ингибиторов репликативного и репаративного синтеза ДНК 1- β -D-

арабинофуранозилцитозина и гидроксимочевины при облучении клеток ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками позволяет оценить относительный вклад ЭДР ДНК в суммарный выход ДР при действии ионизирующих излучений разного качества. При действии излучений с малой ЛПЭ этот вклад может быть весьма высок, однако, для тяжёлых заряженных частиц с высокой ЛПЭ он становится пренебрежимо малым.

ВЫВОДЫ

1. При действии γ -квантов и ускоренных ионов наблюдается линейный характер дозовых зависимостей выхода ДР ДНК, который сохраняется как в нормальных условиях, так и в условиях влияния ингибиторов синтеза и репарации ДНК.

2. С ростом ЛПЭ излучений от 44 кэВ/мкм до 160 кэВ/мкм эффективность влияния ингибиторов синтеза и репарации ДНК на формирование первичных повреждений снижается, что проявляется в увеличении вклада прямых и снижении вклада энзиматических ДР ДНК в суммарный выход ДР ДНК.

3. В ходе репарации, как при облучении γ -квантами, так и ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N , количество ДР ДНК снижается по экспоненциальной кинетике и практически завершается через 6 ч пострadiационной инкубации.

4. В условиях влияния ингибиторов, в отличие от нормальных условий, при облучении γ -квантами наблюдается резкое увеличение выхода ДР ДНК в течение всего периода пострadiационной инкубации.

5. При облучении ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N в условиях влияния ингибиторов синтеза и репарации ДНК с ростом ЛПЭ частиц степень восстановления ДР ДНК увеличивается, что обусловлено снижением эффективности действия ингибиторов в связи с отсутствием модифицируемого субстрата.

6. Снижение значений ФИД при увеличении ЛПЭ излучений указывает на изменение соотношения выхода прямых и энзиматических ДР ДНК, что подтверждает переход от репарационно-зависимых повреждений к прямым радиационно-индуцированным при высокой плотности ионизации.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Чаусов В.Н.**, Борейко А.В., Красавин Е.А., Можаяева А.В., Равначка И.И., Тиунчик С.И., Тронов В.А. Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии ускоренных тяжелых ионов различных энергий // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т. 49. – № 1. – С. 73-77.

2. Борейко А.В., **Чаусов В.Н.**, Красавин Е.А., Равначка И., Стукова С.И. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ //

Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2011. – Т. 4. – № 167. – С. 670-678.

3. **Чаусов В.Н.**, Борейко А.В., Буланова Т.С., Заднепрянец М.Г., Ильина Е.В., Йежкова Л., Красавин Е.А., Кожина Р.А., Кузьмина Е.А., Куликова Е.А., Смирнова Е.В., Тиунчик С.И. Формирование прямых и энзиматических двунитевых разрывов ДНК в условиях влияния ингибиторов репарации при действии излучений разного качества // Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2018. – Т. 15. – № 6(218). – С. 573-588.

4. Красавин Е.А., Борейко А.В., **Чаусов В.Н.**, Кузьмина Е.А., Кожина Р.А., Тиунчик С.И., Ильина Е.В., Куликова Е.А., Заднепрянец М.Г., Смирнова Е.В., Тимошенко Г.Н. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на биологическую эффективность пучка протонов в модифицированном пике Брэгга // Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2019. – Т. 2. – № 221. – С. 181-190.

5. Красавин Е.А., Борейко А.В., Куликова Е.А., Буланова Т.С., Тимошенко Г.Н., **Чаусов В.Н.** Способ повышения частоты образования двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии ионизирующих излучений в условиях влияния радиомодификаторов // Патент на изобретение RU 2699670 C1, 09.09.2019. Заявка № 2018140538 от 16.11.2018.

6. Erhan S.E., Boreyko A.V., Kozhina R.A., Kuzmina E.A., Ilyina E.V., Tiounchik S.I., **Chausov V.N.** Induction of DNA damage in neuronal cells of mice under the influence of repair inhibitors under the action of gamma-rays *in vivo* // Physics of Particles and Nuclei Letters. – 2022. – V. 19. – № 5. – P. 586-589.

7. Борейко А.В., Заднепрянец М.Г., **Чаусов В.Н.**, Храмко Т.С., Кожина Р.А., Кузьмина Е.А., Тиунчик С.И., Красавин Е.А. Комбинированное действие ингибиторов синтеза ДНК и ускоренных протонов на клетки злокачественных опухолей // Письма в журнал Физика элементарных частиц и атомного ядра. – 2023. – Т. 20. – № 4 (249). – С. 698-708.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АраЦ	– арабинозид цитозин
ГМ	– гидроксимочевина
ДР	– двунитевые разрывы
КП	– кластерные повреждения
ЛПЭ	– линейная передача энергии
ОР	– однострунные разрывы
ПДР	– прямые двунитевые разрывы
ПО	– поврежденные основания
ФБ	– фосфатный буфер
ФИД	– фактор изменения дозы
ЭДР	– энзиматические двунитевые разрывы