

СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

5831/83

9/11-83

19-83-491

Г.Эрцгребер, И.Л.Лapidус, К.Айхорн

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ОБРАЗОВАНИЯ
ДВУХНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК
КЛЕТОК КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА
ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ТЯЖЕЛЫМИ ИОНАМИ

1983

Двухнитевые разрывы /ДР/ представляют собой наиболее грубые деструктивные повреждения молекул ДНК, приводящие к нарушению целостности генетического аппарата. В настоящее время общепризнана коррелятивная связь между числом индуцируемых ДР и жизнеспособностью клетки^{/1-4/}. В последнее время появились указания на существенный вклад в выход индуцируемых γ -облучением ДР ДНК энзиматических ДР - разрывов комплементарных нитей ДНК, возникающих в процессе репарации одонитевых разрывов /ОР/ в клетках млекопитающих; в то же время при воздействии на клетки излучений с высокой линейной передачей энергии /ЛПЭ/ следует ожидать выхода преимущественно прямых ДР ДНК^{/2/}. В связи с этим вопросы исследования закономерностей индукции-репарации ДР ДНК у клеток высших эукариот при воздействии излучений разного качества приобретают особую актуальность при решении проблемы относительной биологической эффективности /ОБЭ/.

Целью настоящей работы явилось применение метода, ранее использованного для определения размеров суперспиральных субъединиц ДНК^{/5,6/}, для определения частоты возникновения ДР при воздействии излучений с разной ЛПЭ. С помощью соответствующего способа лизиса и последующего ультрацентрифугирования^{/7/} удается отделить высвобожденные в результате образования ДР фрагменты ДНК от ДНК-мембранного комплекса /ДМК/ и по суммарной радиоактивности в обоих образующихся пиках определить долю высвобожденной ДНК (F). Для частиц с высокой ЛПЭ /более 10 кэВ/мкм/ F зависит не только от дозы облучения, но и от величины объема, который занимает ДМК. При введении размера этого объема в качестве известного параметра, ранее определенного с помощью других методов^{/8-10/}, открывается возможность оценки частоты возникновения ДР при облучении клеток частицами с высокой ЛПЭ методически более простым образом. В настоящей работе проведено сравнение этих данных со значениями, полученными традиционным методом седиментации в нейтральном градиенте плотности сахарозы, в результате которого обнаружено их хорошее совпадение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки. Клетки китайского хомячка линии V79-4 культивировали в виде монослоя в питательной среде Eagle MEM с 15% сыворотки крови теленка. В течение 18 ч клетки метили ³H-тимидином (удельная активность - 20 Ки/ммоль, концентрация - 5 мКи/мл). В экспоненциальной фазе роста их трипсинизировали (0,01 М этилен-

диаминтетрацетата /ЭДТА/ + 0,25% трипсина), суспендировали в свежей среде при концентрации $0,8-1,0 \cdot 10^6$ клеток в миллилитре и облучали при температуре $0-4^\circ\text{C}$. После облучения суспензию клеток с добавлением 10% диметилсульфоксида /ДМСО/ порциями по 0,1 мл замораживали с помощью жидкого азота и в таком виде сохраняли до обработки.

Облучение. γ -облучение осуществляли в стеклянных пробирках на установке "Свет" (^{137}Cs) при мощности дозы 4,87 Гр/мин. В экспериментах с тяжелыми ионами ^{12}C и ^{16}O клетки облучали на ускорителе У-200 Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ с помощью специального устройства для облучения клеточной суспензии, представленного на рис.1^{11/}. В цилиндрическом блоке из нержавеющей стали /1/ за опорной решеткой /2/ находится фольга из слюды /3/, за которой имеется паз шириной 4 мм и глубиной 80 мкм. Раствор стекает по этому вертикальному пазу, пересекая при этом пучок частиц, и через трубку /4/ подается в улавливающий сосуд /5/. Скорость протекания суспензии, равная примерно 10^{-2} мл/с, достаточно мала для работы в импульсном режиме с длительностью импульса 20 мс. Дозиметрия осуществлялась ионизационной камерой ^{12}C помощью такого практически герметичного устройства, где возможна лишь незначительная, точно измеренная утечка кислорода $/10^9 \text{Па} \cdot \text{м}^3 \cdot \text{с}^{-1}/$, можно облучать клетки при нормальных условиях в дозах примерно до 500 Гр^{12/}. При облучении в больших дозах парциальное давление кислорода в объеме начинает падать за счет эффекта "выжигания кислорода" и в значительной степени за счет потребления кислорода клетками, поэтому облучение в дозах выше 500 Гр следует считать проводимым в аноксических условиях. Таким образом оказалось возможным во время одного цикла

3

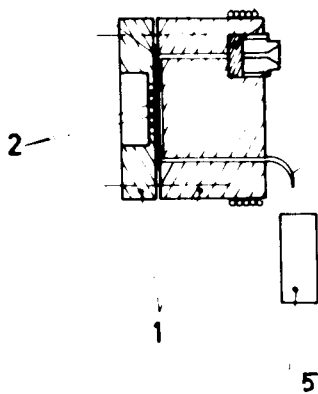


Рис.1. Схема устройства для облучения клеточной суспензии тяжелыми ионами.

облучения оценивать в разных диапазонах доз число возникающих ДР в нормальных и аноксических условиях.

Седиментация /см. также /5/ /.

4 Перед центрифугированием замороженные образцы помещали на поверхность лизирующего раствора, нанесенного, в свою очередь, на поверхность градиента $5 \pm 20\%$ сахарозы. Лизис клеток проводили в течение одного часа в темноте.

Условия определения числа ДР: состав раствора сахарозы - $5 \pm 20\%$ сахарозы в 1 М NaCl, 0,01 М Tris-HCl, 0,01 М ЭДТА, pH 7-7,5; состав лизирующей смеси - 1% додецилсульфата натрия, 0,2% дезокси-

холата натрия, 0,05% цитрата натрия, 0,05 М ЭДТА, pH 7-7,5; пробы центрифугировали 17-24 ч /в зависимости от дозы облучения/ при $20-22^\circ\text{C}$ в ультрацентрифуге VAC-602 /ротор Swing-out/ со скоростью 9000 об/мин.

Условия определения доли высвобожденной ДНК: состав раствора сахарозы - $5 \pm 20\%$ сахарозы в 2 М NaCl, 0,01 М цитрата натрия, pH 9-9,5; на дно пробирки наносили 0,2 мл 60-процентного раствора сахарозы с насыщенным CsCl; состав лизирующей смеси - 0,2% саркозила, 0,08% дезоксихолата натрия, 2 М NaCl, 0,01 М цитрата натрия, 0,02 М ЭДТА, pH 9-9,5; пробы центрифугировали 3 ч при $20-22^\circ\text{C}$ в ультрацентрифуге VAC-602 со скоростью 20000 об/мин.

После центрифугирования каждый градиент разделяли на 36 фракций, нанося их на бумажные фильтры, радиоактивность определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного β -спектрометра SL-30 /Intertechnique, Франция/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.2 в качестве примера представлены полученные нами профили радиоактивности образцов, облученных γ -лучами в дозах 350 и 1740 Гр и ионами ^{12}C в дозах 490 и 2570 Гр. После лизиса клеток с помощью саркозила становится возможным разделение медленно оседлующих высвобожденных фрагментов и быстро оседлующей ДНК в составе ДМК, опусканию на дно пробирки которого препятствует плотный слой 60-процентной сахарозы с CsCl. О долях обеих частей ДНК можно судить по соотношению суммарных радиоактивностей в обоих образующихся пиках. Из рисунка хорошо видно, что большей дозе облучения соответствует большая доля ДНК, высвобождаемой из ДМК.

Полученные таким образом значения F в зависимости от дозы γ -облучения представлены на рис.3. Сплошной линией обозначена расчетная кривая, наилучшим образом совпадающая с экспериментальными данными $/M_0 \cdot s = 1,08 \cdot 10^{-2} / \text{Дальтон}^{-1}$, где M_0 - молекулярный вес субъединицы, s - выход ДР ДНК/.

На рис.4 а и б представлены экспериментальные данные для ионов ^{12}C с ЛПЭ 250 кэВ/мкм. Сплошные линии - теоретически рассчитанные зависимости F(D) для трех разных частот ДР: $0,8 \cdot 10^{-11}$, $1,10 \cdot 10^{-11}$ и $1,47 \cdot 10^{-11} \text{Гр}^{-1} \text{Д}^{-1}$, причем каждая нижняя кривая отвечает диаметру объема субъединицы 0,2 мкм, а верхняя - 0,3 мкм, значения которых определены в работе^{6/}. Из сравнения экспериментальных и расчетных данных следует, что наилучшее совпадение в случае малых доз наблюдается при $s = 1,10 \cdot 10^{-11} \text{Гр}^{-1} \text{Д}^{-1}$. Как и ожидалось, в случае больших доз облучения и использованной нами техники облучения в аноксических условиях /рис.4а/ совпадение достигается только при малых значениях $s = 0,6 \cdot 10^{-11} \text{Гр}^{-1} \text{Д}^{-1}$.

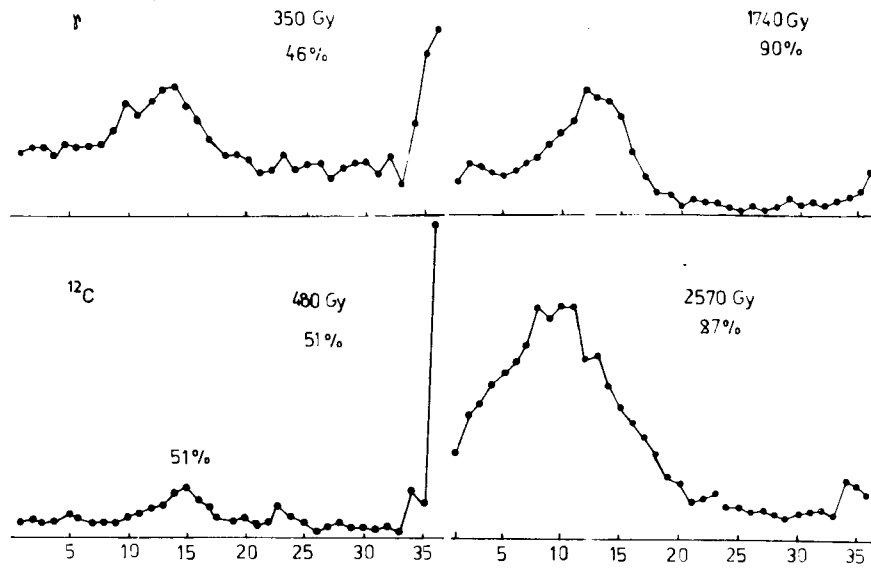


Рис.2. Профили радиоактивности (^3H), полученные в результате обработки проб, облученных γ -лучами и ионами ^{12}C . По оси абсцисс - номера фракций, по оси ординат - радиоактивность в относительных единицах.

Рис.3. Доля высвобождаемой ДНК в зависимости от дозы γ -облучения. По оси абсцисс - доза в Гр, по оси ординат - доля высвобождаемой ДНК в %. Кривая рассчитана по уравнению /2/ в /6/, \circ - экспериментальные данные.

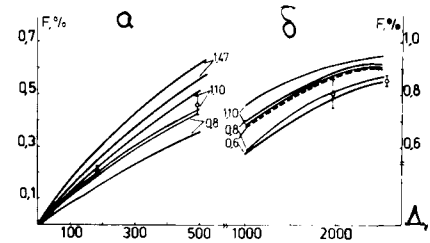
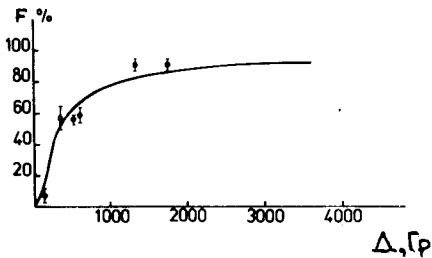
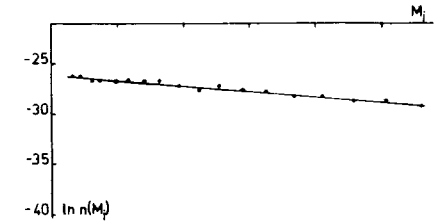
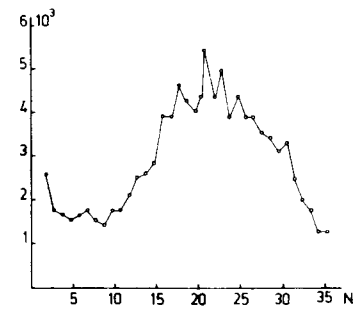
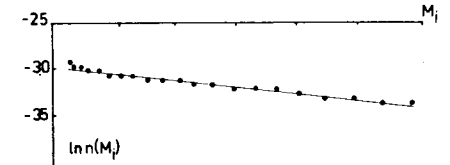
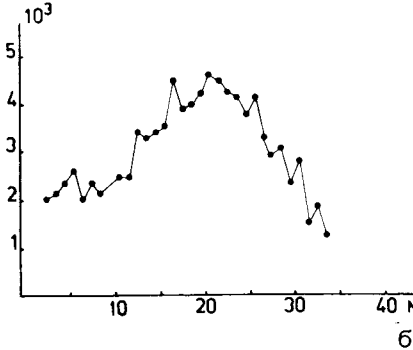


Рис.4. Доля высвобождаемой ДНК в зависимости от дозы облучения ионами ^{12}C /ЛПЭ = 250 кэВ/мкм/. По оси абсцисс - доза в Гр, по оси ординат - F, %. Сплошные кривые рассчитаны по уравнению /2/ из /6/ для значений $s = 0,8 \cdot 10^{-11}, 1,1 \cdot 10^{-11}$ и $1,47 \cdot 10^{-11} \text{ Гр}^{-1} \text{ д}^{-1}$ при двух диаметрах объема - 0,2 и 0,3 мкм - для каждого s : \circ - экспериментальные данные; а - диапазон малых доз /облучение в нормальных условиях/, б - диапазон больших доз /облучение в условиях, близких к анокисическим/.

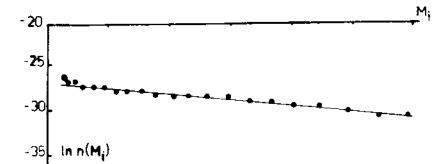
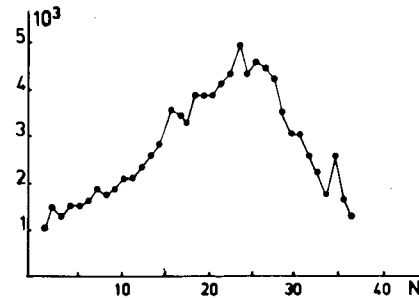
а - диапазон малых доз /облучение в нормальных условиях/, б - диапазон больших доз /облучение в условиях, близких к анокисическим/.



а



б



в

Рис.5. Профили радиоактивности и результаты регрессионного анализа при определении числа ДР традиционным методом после применения разных видов излучения: а - γ -лучи, б - ^{12}C , в - ^{16}O . Левая часть: по оси абсцисс - номера фракций, по оси ординат - радиоактивность в относительных единицах. Правая часть: по оси абсцисс - номера фракций, по оси ординат - молекулярный вес фракций.

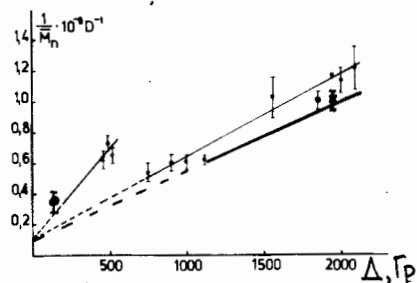


Рис.6. Обратная величина среднечисленного молекулярного веса в зависимости от дозы облучения. По оси абсцисс - доза в Гр, по оси ординат $-1/\bar{M}_n, 10^{-8} \text{ Д}^{-1}$; \bullet - γ -лучи, \circ - ^{12}C , \times - ^{16}O .

Для γ -излучения при введении $M_0 \approx 2,4 \cdot 10^9 \text{ Д}$, определенного для тех же клеток с помощью седиментации суперспиральных ДМК в градиенте плотности сахарозы с бромистым этидием^{/8/}, получается значение $s = 4,5 \cdot 10^{-12} \text{ Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$.

Как отмечалось выше, определение частот ДР традиционным методом седиментации в нейтральном градиенте плотности сахарозы проводилось на аликвотах тех же самых проб, которые использовались в описанных выше экспериментах. На рис.5 в качестве примера представлено несколько профилей, полученных после облучения γ -лучами /750 Гр/, ионами ^{12}C /470 Гр/ и ионами ^{16}O /490 Гр/. Рядом расположены соответствующие данные регрессионного анализа, линейный вид которых свидетельствует о хорошей статистике. Полученные значения $1/\bar{M}_n$ в зависимости от дозы облучения для этих трех видов излучения представлены на рис.6. Наклон этих прямых позволяет определить следующие значения выхода ДР: в нормальных условиях для ^{137}Cs - $5,3 \cdot 10^{-12} \text{ Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$, ^{12}C - $1,3 \cdot 10^{-11} \text{ Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$, ^{16}O - $1,1 \cdot 10^{-11} \text{ Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$; в анаоксических условиях для ^{12}C - $5,3 \cdot 10^{-12} \text{ Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$, ^{16}O - $4,5 \cdot 10^{-12} \text{ Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$. В дополнение к вышеизложенному на рис.7 представлены все имеющиеся в литературе экспериментальные данные о выходе ДР ДНК для клеток китайского хомячка в зависимости от ЛПЭ, причем треугольниками Δ обозначены значения s , полученные нами в данной работе традиционным методом, а кружочками - данные, взятые из работ^{/13,14/}, определенные на основе идентичных методов культивирования клеток и седиментации. Эти данные являются единственными в своем роде в столь широком диапазоне ЛПЭ.

Таким образом, частоты ДР, определенные двумя указанными независимыми методами, хорошо совпадают. Это открывает возможность определения частот ДР по методу высвобождения ДНК. О репарации ДР можно было бы судить по уменьшению суммарной радиоактивности в пике, отвечающем высвобожденной ДНК, что легче и надежнее, чем определение по незначительному перемещению пика в стандартном методе. Применявшийся нами метод представляется более простым, так как значительно сокращается время проведения экспериментов, отпадает необходимость обработки данных с помощью ЭВМ, и, кроме того, в отличие от традиционного метода, применимого только при дозах облучения 500-1500 Гр, он может быть использован в диапазоне значительно меньших доз /до 400 Гр/.

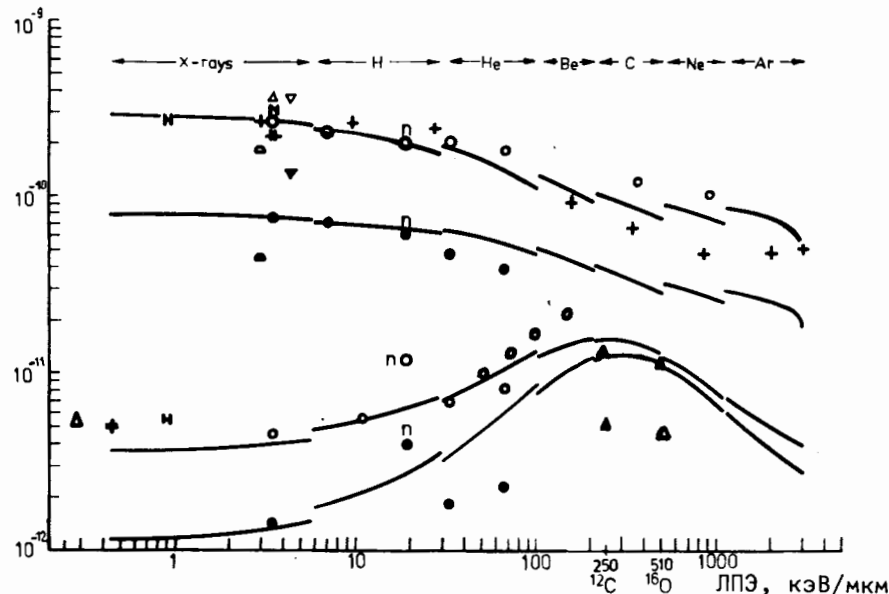


Рис.7. Число ДР ДНК клеток китайского хомячка линии V79-4 в зависимости от ЛПЭ. По оси абсцисс - ЛПЭ, кэВ/мкм по оси ординат - частота ДР ДНК, $\text{Гр}^{-1} \text{ Д}^{-1}$. Сплошные кривые - результат теоретического анализа^{/15/}; светлые символы соответствуют облучению в нормальных условиях / Δ - наши данные, \circ - данные из работ^{/13,14/}, темные - облучению в условиях, близких в анаоксическим / \bullet - наши данные, \bullet - данные из^{/13/}, остальными символами обозначены данные из работы^{/15/}.

Авторы глубоко признательны академику Г.Н.Флерову за предоставление возможности проведения экспериментов на ускорителе У-200 Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ и д-ру Ю.Дитриху за составление программы и помощь при обработке экспериментальных результатов на ЭВМ. За техническую помощь благодарим А.Круг, М.Лаукнер и Б.Рихтер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Günter K., Schulz W., Leistner W. *studia biophysica*, 1977, 61, p.163.
2. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-929, 19-82-882, 19-82-883, 19-82-928, 19-82-884, Дубна, 1982.
3. Schwarz K., Zinke M. *studia biophysica*, 1979, 76, p.3.
4. Kampf G., Tolkendorf E. *studia biophysica*, 1980, 78, p.1.

5. Kampf G., Regel K. *studia biophysica*, 1978, 73, p.207.
6. Regel G., Günter K., Kampf G. *Rad.Env.Bioph.*, 1983, 21, p.175.
7. Ormerod M.G., Lehmann A.R. *Biochim.Biophys.Acta*, 1971, 228, p.331.
8. Абель X., Эрцгребер Г. ОИЯИ, P19-82-134, Дубна, 1982.
9. Hartwig M. *Acta biol.med.germ.*, 1978, 37, p.421.
10. Cook P.R., Brazell I.A. *Nature*, 1976, 263, p.679.
11. Абель X. и др. ОИЯИ, P19-82-837, Дубна, 1982.
12. Eichhorn K. *Physikalische Grundlagen zur Strahlenbiologie mit beschleunigten leichten und schweren Ionen. Dissertation AdW DDR*, 1980.
13. Kampf G. et al. *studia biophysica*, 1977, 61, p.53.
14. Kampf G., Eichhorn K. *studia biophysica*, 1983, 93, p.17.
15. Günter K., Schulz W. In: *Biophysical Theory of Radiation Actions. A Treatise of Relative Biology Effectivness*, 1982, Akademie Verlag, Berlin.

Рукопись поступила в издательский отдел
11 июля 1983 года.

Эрцгребер Г., Липидус И.Л., Айхорн К. 19-83-491
Определение частоты образования двухнитевых разрывов ДНК клеток китайского хомячка при облучении тяжелыми ионами

Предпринята попытка определения выхода двухнитевых разрывов ДНК клеток китайского хомячка линии V79-4 при облучении ускоренными ионами ^{12}C и ^{16}O методом нахождения доли ДНК, высвобождаемой в результате образования этих разрывов. Результаты анализа сравниваются с данными, полученными авторами с использованием тех же самых проб традиционным методом седиментации в нейтральном градиенте плотности сахарозы. Выходы двухнитевых разрывов ДНК, определенные двумя указанными независимыми методами, хорошо согласуются, что открывает возможность изучения индукции и репарации двухнитевых разрывов с помощью более простого и надежного метода высвобождения ДНК.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1983

Erzgräber G., Lapidus I.L., Eichhorn K. 19-83-491
Determination of the DNA Double-Strand Break Yield in Chinese Hamster Cells after the Irradiation with Heavy Ions

An attempt is made to determine the yield of the DNA double strand breaks in Chinese hamster cells (V79-4) after the irradiation with accelerated ^{12}C and ^{16}O ions by determining the percentage of DNA released due to these breaks. The results of the analysis are compared with the data, which the authors obtained with the help of the same samples by the traditional method of sedimentation in the sucrose neutral density gradient. Yields of the DNA double-strand breaks determined by the two independent methods are in good coincidence, which makes it possible to study the DNA double-strand breaks induction and repair with the help of a simple and more reliable method of the DNA release.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1983

Перевод М.Потапова