

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-718

Р.Д.Говорун, Е.А.Красавин, Е.А.Насонова,
А.П.Череватенко

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА ДНК
НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТOK
МЛЕКОПИТАЮЩИХ К ДЕЙСТВИЮ ИЗЛУЧЕНИЙ
С РАЗНОЙ ЛИНЕЙНОЙ ПЕРЕДАЧЕЙ ЭНЕРГИИ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1985

В последнее время получены убедительные свидетельства того, что на величину относительной биологической эффективности /ОБЭ/ излучений с разной линейной передачей энергии /ЛПЭ/ оказывает существенное влияние способность клеток к восстановлению от лучевых повреждений ^{1-3/}. В исследованиях, выполненных на клетках *Escherichia coli*, различающихся по способности к репарации повреждений ДНК, установлено ^{4,5/}, что при действии излучений с низкой и высокой ЛПЭ в ДНК клеток индуцируются летальные повреждения - двунитевые разрывы ДНК /ДР/, различные по своему происхождению. При γ -облучении возникают преимущественно энзиматические двунитевые разрывы /ЭДР/, образующиеся в процессе репарации протяженных брешей в нитях ДНК, выход которых зависит от многих факторов биологической природы. При действии частиц с высокой ЛПЭ индуцируются в основном прямые ДР /ПДР/ ДНК, выход которых определяется лишь физическими свойствами излучений.

К настоящему времени накапливаются данные, указывающие на то, что и у клеток млекопитающих при γ -облучении индуцируются ЭДР ДНК, выход которых определяется балансом альтернативных групп ферментов, осуществляющих деградацию и ресинтез ДНК в процессе репарации лучевых повреждений ^{6/}. С использованием ингибиторов синтеза ДНК арабинозидцитозина /АраЦ/ и оксимочевина /ОМ/, угнетающих не только репликативный, но и репаративный синтез, выявлено повышение радиочувствительности клеток вследствие увеличения выхода ЭДР ДНК. В процессе репарации коротких /примерно 100 нуклеотидов/ брешей в нитях ДНК с определенной вероятностью происходит атака эндонуклеазами, специфичными к однонитевой ДНК, участков, оппозитных брешам ^{6/}. В результате этого происходит трансформация однонитевых разрывов в двунитевые, являющиеся молекулярным субстратом формирования летальных повреждений в клетках млекопитающих ^{6-8/}. Исходя из этого, можно ожидать, что при действии на клетки излучений с высокой ЛПЭ сенсibiliзирующего влияния АраЦ + ОМ наблюдаться не будет, поскольку в этом случае в ДНК индуцируются преимущественно прямые ДР. Если это предположение соответствует действительности, то в условиях влияния АраЦ + ОМ должно происходить увеличение чувствительности клеток к излучениям с низкой ЛПЭ и, как следствие, снижение величины ОБЭ излучений с высокой ЛПЭ. Для проверки этого предположения и была выполнена настоящая работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали перевиваемую культуру клеток китайского хомячка У79-4. Культивирование проводили в среде Игла с добавлением глутамина и 20% сыворотки крови крупного рогатого скота. Для γ -облучения использовали либо суспензию трехсуточной культуры в питательной среде $5 \cdot 10^5 - 10^6$ клеток в 1 мл/, либо монослой клеток, выращиваемых во флаконах Карреля. Суспензию клеток облучали в пробирках, монослой клеток - во флаконах Карреля.

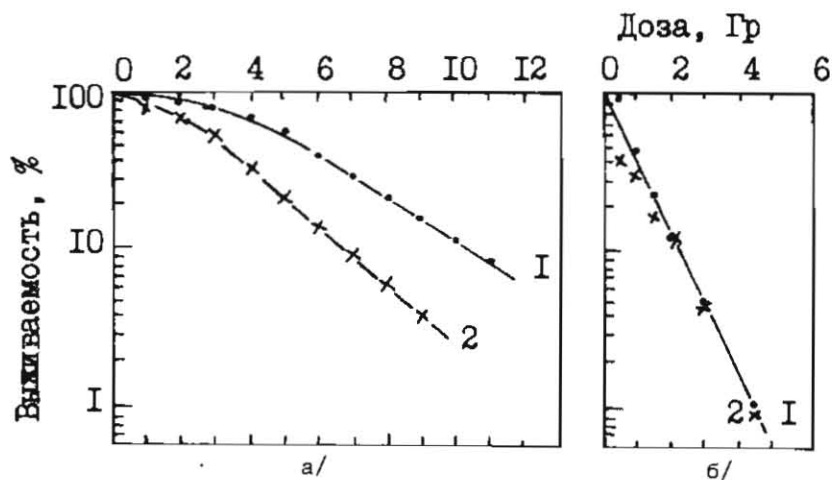
Для облучения ускоренными тяжелыми ионами монослой клеток выращивали в специально изготовленных стеклянных цилиндрах длиной 30 мм и диаметром 13 мм, дном которых служила пленка из поликарбоната толщиной 8 мкм, приклеиваемая ЦИАКРИНОМ-ЭО. Диаметр цилиндра определялся размером пучка тяжелых ионов, толщина пленки - малой величиной пробега тяжелых ионов в ткани. Монослой клеток облучали через поликарбонатную пленку.

В качестве ингибиторов репаративного синтеза ДНК применяли арабинозидцитозин /2,2'-anhydro 1- β -arabinofuranosylcytosine-HCl/ производства фирмы Serva /ФРГ/ и оксимочевину, синтезированную в ЛИАФ АН СССР. Концентрация АраЦ и ОМ была соответственно равной 0,1 мМ/мл и 4 мМ/мл^{7/6/}. Указанные агенты вводили в питательную среду за 30 - 40 мин до облучения. После облучения клетки выдерживали в условиях влияния АраЦ + ОМ еще в течение 1,5 - 2ч, после чего высевали в чашки Петри для оценки выживаемости. Подсчет числа колоний проводили через 8 - 9 сут после облучения.

В качестве источников ионизирующих излучений использовали γ -кванты ^{137}Cs и ускоренные ионы углерода с энергией $6,6 \pm 0,4$ МэВ/нуклон и ЛПЗ = 227 ± 10 кэВ/мкм. Облучение γ -квантами ^{137}Cs проводили с мощностью дозы 4,6 Гр/мин. Источником ионов углерода служил ускоритель У-200 Объединенного института ядерных исследований. Мощность дозы ионов углерода составила 12 Гр/мин. Методическая неопределенность величин поглощенной дозы, обусловленная, в основном, дисперсией энергии ионов углерода, падающих на объект, не превышала +5%. Облучение проводили на специально созданной установке с комплексом электронно-физической аппаратуры. Статистическую обработку полученных результатов проводили на ЭВМ. Радиочувствительность $/D_0^{-1}/$ клеток и величину экстраполяционного числа $/d/$ кривых выживания определяли путем вычисления и минимизации суммы квадратов, используя упрощенный метод Розенброка^{9/}. Ошибки относительных величин определены из наибольшей ошибки любой из двух сопоставляемых величин, полученных в параллельных опытах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке представлены кривые выживания $/S/$ клеток в зависимости от дозы $/D/$ γ -облучения в стандартных условиях и при инкубации в среде, содержащей АраЦ + ОМ. Как можно видеть, кривые



Влияние арабинозидцитозина и оксимочевины на выживаемость клеток китайского хомячка при γ -облучении /а/ и действии ускоренных ионов углерода /б/. 1 - в стандартных условиях, 2 - в присутствии АраЦ + ОМ.

выживания при облучении клеток в стандартных условиях имеют сигмоидный вид и величина d равна ~ 3 . Инкубация облученных клеток в среде, содержащей АраЦ + ОМ, отчетливо модифицирует кривую выживания: наблюдается увеличение величины экстраполяционного числа и происходит увеличение угла наклона экспоненциального участка кривой. Радиочувствительность клеток возрастает в $1,71 \pm 0,09$ раз /см.таблицу/.

При облучении клеток ускоренными ионами углерода характер зависимости S/D в стандартных условиях и в условиях влияния АраЦ + ОМ существенно иной, чем при γ -облучении /см.рисунок/. Во-первых, кривые выживания в обоих случаях экспоненциальные и, во-вторых, сенсибилизирующее влияние АраЦ + ОМ отсутствует. Величина коэффициентов ОБЭ ионов углерода в условиях влияния АраЦ + ОМ снижается: при облучении клеток в стандартных условиях ОБЭ равна $3,09 \pm 0,19$, а в присутствии ингибиторов синтеза ДНК - $1,78 \pm 0,14$. Уменьшение ОБЭ ионов углерода во втором случае можно объяснить тем, что при воздействии на клетки излучениями с низкой ЛПЗ в присутствии ингибиторов репаративного синтеза ДНК выход ЭДР, как уже отмечалось, более высокий, чем при облучении в стандартных условиях^{7/8/}.

Повышение выхода ДР ДНК у облученных рентгеновскими лучами клеток китайского хомячка при инкубации в пострadiационный период в среде, содержащей АраЦ, наблюдали и другие авторы^{10/}.

Таблица

Влияние арабинозидцитозина и оксимочевина на чувствительность клеток китайского хомячка к γ -облучению и действию ускоренных ионов углерода

Тип излучения	Стандартные условия		Арац + Ом		Фид	ОБЭ*
	D_0^{-1}	n	D_0^{-1}	n		
γ -кванты ^{137}Cs	$0,34 \pm 0,02$	3	$0,59 \pm 0,03$	4,5	$1,71 \pm 0,09$	$3,09 \pm 0,19$
Ионы углерода	$1,05 \pm 0,01$	1	$1,05 \pm 0,01$	1	$1,00 \pm 0,01$	$1,78 \pm 0,14$

* ОБЭ определена как отношение D_0^{-1} ионов углерода и γ -излучения.

Аналогичным свойством обладает и арабинозидаденин /АраА/ /11,12/. Следовательно, повышение выхода ДР ДНК энзиматического происхождения при γ -облучении клеток в присутствии ингибиторов репаративного синтеза ДНК и отсутствие такового при действии излучений с высокой ЛПЭ /поскольку в этом случае индуцируются, главным образом, прямые ДР ДНК/ приводит к снижению коэффициентов ОБЭ и у клеток высших эукариот. С учетом полученных данных становятся понятными причины, обуславливающие меньшее значение коэффициентов ОБЭ у тех линий клеток млекопитающих, которые имеют дефекты в системе репарации ДНК /13,14/.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что не только у прокариот, но и у клеток высших эукариот величина ОБЭ излучений с разной ЛПЭ определяется двумя факторами: физическим, обуславливающим выход нерепарируемых /либо трудно репарируемых/ повреждений, и биологическим, направленным на ликвидацию повреждений ДНК.

Авторы благодарят академика Г.Н.Флорова и профессора Ю.Ц.Оганесяна за предоставление возможности постановки экспериментов на ускорителе У-200, а также У.Зодан - за помощь при проведении опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корогодина В.И. и др. Радиобиология, 1977, т.18, в.5, с.700.
2. Петин В.Г., Кабакова Н.М. Радиобиология, 1978, т.18, в.1, с.40.
3. Fritz-Niggli H., Bushi C., Schweizer P. Radiation Environmental Biophysics, 1981, vol.19, 2, p.265.
4. Амиртаев К.Г. и др. Радиобиология, 1985, т.25, вып.1, с.20.
5. Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-85-563, Дубна, 1985.
6. Филатов М.В., Носкин Л.А., Коношенко Н.В. В кн.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. "Наука", М., 1983, с.213.
7. Natarajan A.T., Obe G. International Journal of Radiation Biology, 1979, vol.36, 4, p.410.
8. Bender M.A. In: DNA Repair and Mutagenesis in Eucaryotes. Plenum Press, N.Y., 1980, p.245.
9. Amirtaev K.G. et al. Studia biophysica, 1985, vol.106. No.2, p.131.
10. Ahnström G., Bryant P. International Journal of Radiation Biology, 1982 vol.41, 6, p.671.
11. Iliakis G. Radiation Research, 1980, vol.83, p.536.
12. Bryant P.E. British Journal of Cancer, 1984, vol.46, supplement 6, p.61.
13. Walicka M., Koerner I., Studia biophysica, 1982, vol.87, 1, p.47.

14. Tobias C.A., et al. *British Journal of Cancer*, 1984, vol.49, supplement 6, p.175.
15. Корогодин В.И., Красавин Е.А. *Радиобиология*, 1982, т.22, № 6, с.727.
16. Thacker I., Stretch A., Steppens M., *International Journal of Radiation Biology*, 1979, vol.36, 2, p.137.

В Объединенном институте ядерных исследований начал выходить сборник "*Краткие сообщения ОИЯИ*". В нем будут помещаться статьи, содержащие оригинальные научные, научно-технические, методические и прикладные результаты, требующие срочной публикации. Будучи частью "*Сообщений ОИЯИ*", статьи, вошедшие в сборник, имеют, как и другие издания ОИЯИ, статус официальных публикаций.

Сборник "*Краткие сообщения ОИЯИ*" будет выходить регулярно.

The Joint Institute for Nuclear Research begins publishing a collection of papers entitled *JINR Rapid Communications* which is a section of the *JINR Communications* and is intended for the accelerated publication of important results on the following subjects:

- Physics of elementary particles and atomic nuclei.
- Theoretical physics.
- Experimental techniques and methods.
- Accelerators.
- Cryogenics.
- Computing mathematics and methods.
- Solid state physics. Liquids.
- Theory of condensed matter.
- Applied researches.

Being a part of the *JINR Communications*, the articles of new collection like all other publications of the Joint Institute for Nuclear Research have the status of official publications.

JINR Rapid Communications will be issued regularly.



Рукопись поступила в издательский отдел
5 октября 1985 года.