

**К.В. Нестерова^{2,*}, А.В. Борейко^{1,2}, Т.С. Храмко^{1,2}, М.Е. Крупнова¹, Н.В. Пахомова¹,
Е.В. Смирнова¹, А.В. Ясинская¹, М.А. Попова², И.А. Шаврин³, М. Лал¹**

¹Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

²Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

³Московский государственный университет, Москва, Россия

e-mail: nkv.22@uni-dubna.ru

Отличительной особенностью опухолевых клеток является их высокая радиорезистентность, что при стандартной радиотерапии может приводить к повторному разрастанию опухолевой ткани и метастазированию. Совместное применение ингибиторов репарации, препятствующих корректному восстановлению целостности ДНК после воздействия ионизирующего излучения, является одним из подходов к преодолению радиационной устойчивости опухолевых клеток.

Как известно, двунитевые разрывы ДНК (ДР ДНК), индуцируемые ионизирующим излучением, являются одними из наиболее тяжелых повреждений ДНК, некорректное восстановление которых сопровождается индукцией клеточной гибели [1].

В данной работе исследовано модифицирующее действие ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) NU7026 при действии рентгеновского излучения на клетки меланомы B16. Механизм действия NU7026 заключается в конкурентном связывании с АТФ-карманом каталитической субъединицы ДНК-ПК, что препятствует ее функционированию вследствие отсутствия энергии. Это приводит к частичной блокаде репарации ДР ДНК путем негомологичного воссоединения концов, что повышает радиочувствительность опухолевых клеток [2].

При возникновении ДР ДНК, ДНК-ПК фосфорилирует гистон H2AX (γ H2AX), являющийся одним из центральных белков разворачивающегося репарационного ответа, который служит платформой для рекрутирования белков репарации, в том числе MDC1, который далее привлекает белок 53BP1 [3]. Белок γ H2AX сигнализирует о наличии ДР ДНК, а белок 53BP1 способствует активации пути негомологичного соединения концов.

В работе использовали клетки меланомы мыши B16 (МРНЦ им. А.Ф. Цыба, г. Обнинск). За 15-18 ч до облучения клеточную суспензию B16 наносили на 96-луночные планшеты, флаконы площадью 25 см² и чашки Петри со стеклянным дном. Затем за 1 ч до облучения добавляли ингибитор NU7026: для оценки жизнеспособности использовали концентрации от 5 до 20 мкМ, для оценки выживаемости и формирования γ H2AX и 53BP1 фокусов – 20 мкМ. Облучение проводили на установке SARRP (U = 130 кВ, SSD = 33 см, I = 7,2 мА, $\dot{D}$ = 1,5 Гр/мин, фильтр алюминиевый 1 мм).

Для оценки жизнеспособности образцы фиксировали в 96% этаноле через 72 часа после облучения, окрашивали флуоресцентным красителем dsGreen и анализировали на планшетном ридере INNO-S. Для оценки выживаемости по методу макроколоний через 2 часа после облучения клеточная культура предварительно снималась с подложки и высевалась на 9 см чашки Петри для последующей культивации в течение 10 дней. По окончании инкубации чашки Петри фиксировались в 96% этаноле и окрашивались кристаллическим фиолетовым.

Для изучения кинетики репарации ДР ДНК проводили иммуноцитохимическое окрашивание с использованием γ H2AX и 53BP1 маркеров. Для этого клеточные образцы предварительно фиксировались в нейтральном 4% параформальдегиде через 1, 4, 6 и 24 ч после облучения, окрашивались смесью первичных антител специфичных к γ H2AX и 53BP1 белкам и вторичных конъюгированных с флуоресцентными метками. Далее была проведена визуализация γ H2AX и 53BP1 фокусов с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager.M2, оснащенного световой системой оптического секционирования ApoTome.2 и монохромной цифровой камерой AxioCam MRm r.3.1 (Carl Zeiss) и автоматический количественный анализ в программе JQuant+.

Для оценки токсичности и эффективной концентрации ингибитора NU7026, проводили первичную оценку жизнеспособности клеток B16 с использованием флуоресцентного ДНК-интеркалирующего красителя dsGreen. Результаты подтвердили, что выбранная концентрация NU7026 — 20 мкМ —

является слаботоксичной, а комбинированное действие облучения и ингибитора дает выраженный эффект снижения жизнеспособности клеток В16.

Анализ формирования макроколоний показал (рис. 1, В), что при действии рентгеновского излучения (1, 2, 3, 4 и 5 Гр) в условиях влияния NU7026 выживаемость клеток снижается: фактор изменения дозы (ФИД) для 10% выживаемости составил $1,33 \pm 0,28$. При этом совместное применение облучения и ингибитора обладает синергическим эффектом: коэффициент синергизма варьировал от $0,292 \pm 0,002$ до $0,471 \pm 0,022$.

Изучена кинетика формирования и элиминации радиационно-индуцированных γ H2AX и 53BP1 фокусов (РИФ) при действии рентгеновского излучения (1,25 Гр) и ингибитора репарации NU7026 (20 мкМ). Результаты показали (рис. 1, А и Б), что при облучении без ингибитора максимум формирования РИФ приходится на 1ч пострадиационного периода и к 24ч снижается до контрольного уровня. В то же время, в присутствии NU7026 наблюдается задержка элиминации и наличие персистентных фокусов через 24ч. Добавление NU7026 снижает элиминацию γ H2AX фокусов (рис. 1, А) через 6ч ($P < 0,001$) и 24ч ($P = 0,003$) в 1,4 и 1,3 раза, соответственно. Элиминация 53BP1 фокусов (рис. 1, Б) еще более выражена и снижается в 1,4 раза через 4 часа и в 2 раза через 6ч и 24 часа ($P < 0,001$). Достоверные изменения оценивались с использованием теста Краскела-Уоллиса и теста попарного сравнения Двасс-Стил-Кричлоу-Флингера.

Замедление элиминации γ H2AX и 53BP1 фокусов указывает на сложность сформированных ДР ДНК при совместном влиянии облучения и NU7026, что отразилось в снижении жизнеспособности в первые 72ч и выживаемости клеток В16 в более отдаленном периоде.

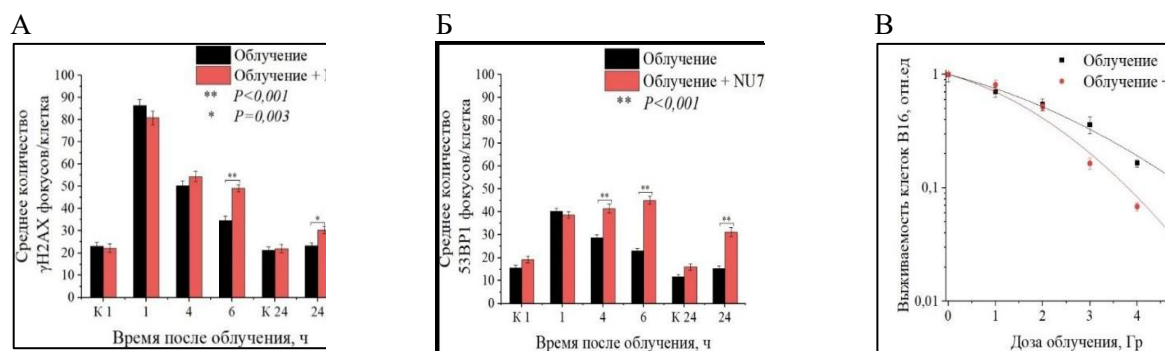


Рис. 1. Кинетика формирования и элиминации γ H2AX (А) и 53BP1 (Б) фокусов в ядрах клеток В16 при действии рентгеновского облучения в дозе 1,25 Гр при совместном использовании с ингибитором репарации NU7026 (20 мкМ). Представлены средние значения количества γ H2AX и 53BP1 фокусов на клетку $\pm$ стандартные ошибки. Дозовая зависимость выживаемости (В) клеток В16 при действии рентгеновского облучения в дозах от 1 до 5 Гр при совместном использовании с ингибитором репарации NU7026 (20 мкМ). Представлены средние значения количества колоний В16 $\pm$ стандартные ошибки. Аппроксимация выполнена на основе линейно-квадратичной модели $S(D) = e^{-aD - bD^2}$.

Литература

1. Chaousov V. N. и др. Formation of Direct and Enzymatic DNA Double-Strand Breaks in the Presence of Repair Inhibitors after Exposure to Radiations of Different Quality // Phys. Part. Nuclei Lett. 2018. Т. 15, № 6. С. 700–710.
2. Kostyushev D. и др. Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9 // Sci Rep. 2019. Т. 9, № 1. С. 1847.
3. Depes D. и др. Single-molecule localization microscopy as a promising tool for γ H2AX/53BP1 foci exploration // Eur. Phys. J. D. 2018. Т. 72, № 9. С. 158.