

ИНДУКЦИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОТОНОВ И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ МОДИФИКАТОРОВ

В.Н. Чаусов^{1,2}, Р.А. Кожина¹, Е.А. Кузьмина^{1,2}, С.И. Тиунчик¹,
А. В. Борейко^{1,2}

¹ - Лаборатория радиационной биологии, Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

² - Государственный университет «Дубна»

E-mail: chausov@jinr.ru

Изучено модифицирующее влияние арабинозид цитозина (АраЦ), гидроксимочевины (ГМ) и SCR7 пиразина на частоту образования двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках глиобластомы человека U87 и меланомы мышей В16 при действии протонов и рентгеновского излучения. Методом ДНК-комет определены зависимости частоты образования ДР ДНК и кинетика их репарации в опухолевых клетках при облучении в обычных условиях и в присутствии модификаторов in vitro. Показано, что количество формируемых при облучении всеми типами использованных излучений ДР ДНК в условиях влияния АраЦ достоверно возрастает. В условиях влияния комплекса

модификаторов – АраЦ+ГМ и АраЦ+SCR7 выход ДР ДНК увеличивается. Величина фактора изменения дозы составляет ~2.01 и 1,58, соответственно. Изучена кинетика репарации ДР ДНК в условиях влияния радиомодификаторов. Показано, что в нормальных условиях элиминация повреждений реализуется по экспоненциальной кинетике и к 6 часам практически заканчивается. В условиях влияния ингибиторов к 6 ч пострадиационной инкубации происходит некоторое возрастание количества ДР ДНК с последующим их снижением к 24 ч наблюдения.

Ключевые слова: двунитевые разрывы, репарация ДНК, ингибиторы репарации, араЦ, арабинозид цитозин, глиобластома, меланома

Поиск подходов, направленных на изменение чувствительности нормальных и опухолевых клеток к действию ионизирующих излучений, является одной из приоритетных задач радиобиологии. Перспективными представляются исследования модифицирующего действия агентов, влияющих на процессы индукции и репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК – арабинозид цитозин (АраЦ), гидроксимочевина (ГМ) и SCR7 пирозин.

Ранее нами было изучено модифицирующее влияние арабинозид цитозина (АраЦ) и гидроксимочевины (ГМ) на чувствительность нормальных клеток к действию излучений, с разными физическими характеристиками [1; 2]. АраЦ является эффективным ингибитором ДНК-полимеразы α , и в меньшей степени β , ведущих репаративный синтез ДНК [3]. При длительной фиксации нерепарируемых прямых одностранных разрывов (ОР) ДНК, либо ОР, образующихся в ходе эксцизионной репарации модифицированных оснований, такие повреждения ДНК могут являться сайтами при формировании энзиматических ДР ДНК в результате атаки нити, оппозитной поврежденному участку, эндонуклеазами типа S1. Это обуславливает высокий суммарный выход ДР ДНК [4] при действии излучений с низкими величинами ЛПЭ.

Поскольку на выход ДР ДНК может оказывать влияние эффективность работы систем репарации, то возникает необходимость в изучении комбинированного действия различного рода модификаторов, ингибирующих отдельные этапы репарации и повышающих эффективность работы АраЦ. В настоящей

работе в качестве таких модификаторов были использованы ингибиторы репарации и репликации ДНК – гидроксимочевина, а также ингибитор лигазы IV – SCR7 пиразин.

Целью данной работы было изучение особенностей индукции и репарации ДР ДНК в опухолевых клетках – глиобластомы человека линии U87 и меланомы мышей линии B16, при действии протонов и рентгеновского излучения в условиях модифицирующего действия ингибиторов репарации.

Методы и материалы

Клеточная культура. Клетки глиобластомы человека U87 и меланомы мышей B16 культивировали в среде IMDM с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и 1%-ного раствора гентамицин-L-глутамин (все реактивы Sigma-Aldrich, Германия) в пластиковых культуральных флаконах T25 при 37 °C и 5%-м содержанием CO₂ в атмосфере. Перед облучением (16-18 ч) клеточную суспензию наносили на покровные стекла, размещенные в пластиковых чашках Петри диаметром 35 мм (“MatTek Corporation”, США). За один час до облучения в культуральную среду добавляли растворы ингибиторов до необходимой концентрации: АраЦ (20 мкМ), ГМ (2 мМ) и SCR7 пиразина (100 мкМ), после чего клетки инкубировали при 37 °C. Клеточные образцы облучали при комнатной температуре в условиях 80% конфлюентности монослоя клеток. Непосредственно после облучения образцы помещали в CO₂ термостат с поддерживаемой температурой 37 °C.

Облучение. Облучение протонами проводили на медицинском пучке ускорителя фазотрон Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Дзелепова ОИЯИ в дозах 1-5 Гр. Начальная энергия протонов на входе в кабину составляла (170±10) МэВ, ЛПЭ протонов с энергией 170 МэВ – 0,49 кэВ/мкм. С помощью гребенчатого фильтра пик Брэгга модифицирован по 90%-му изоуровню мощности дозы и расширен до 2 см. Мощность дозы составляла ~ 1,5 Гр/мин. В эксперименте протонный пучок перед пересечением монослоя клеток проходил через стеклянное дно чашки Петри толщиной 170 мкм под углом 10°, при этом разброс энергии в пучке сузился до 0-44,7 МэВ, а с учетом воздуха – до 0-44 МэВ [5]. В однородном поле излучения размерами 8×8 см одновременно облучалось 8 чашек Петри.

Облучение рентгеновскими лучами проводили в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ в дозах 1-5 Гр на установке Precision CellRad (5 мА, 130 кВ, 1,5 Гр/мин) при комнатной температуре.

Метод ДНК-комет. Суспензию облученных клеток смешивали при 37 °С с 1%-ным раствором легкоплавкой агарозы, имеющей низкую температуру затвердевания, в соотношении 1:5. На предметные стекла наносили 60 мкл приготовленной смеси и, накрыв покровным стеклом, помещали в холодильник на 5 мин, затем покровное стекло осторожно удаляли. Полученные слайды переносили в емкость с лизирующим раствором, установленную в холодильнике. Лизис проводили в течение 12 – 14 ч. Для определения выхода ДР ДНК проводили электрофорез в нейтральных условиях при напряжении 0,5 В/см в течение 40 мин в низкосолеовом ТАЕ-буфере (рН 8,3; Панэко, Россия). Далее проводили нейтрализацию 0,4 М раствором Трис-НСl (рН 7,4; Панэко, Россия). Данную процедуру повторяли трижды. После того, как слайды хорошо просыхали на воздухе, их помещали в емкости с метанолом на 15 мин при комнатной температуре для окончательной дегидратации и фиксации ДНК. Полученные слайды прокрашивали йодистым пропидием (6 мкг/мл). С каждого слайда регистрировали ~100 – 200 комет.

Обработку изображения «кометы» проводили с помощью программы CASP [6].

Статистический анализ и обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, США) и Prism (Systat Software Inc.). Статистическую значимость межгрупповых различий для выборок устанавливали по критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для описательной статистики использовали средние значения показателей и стандартную ошибку.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены зависимости частоты образования ДР ДНК и кинетика их репарации в клетках глиобластомы при облучении протонами в обычных условиях и в присутствии модификаторов. Как можно видеть, наибольшее модифицирующее влияние на выход ДР оказывает комбинация агентов АраЦ+ГМ. Величина фактора изменения дозы (ФИД),

определяемая как $\text{ФИД} = \text{кмод}/\text{кнорм}$, где кмод и кнорм – параметры наклона зависимостей «доза-эффект» при действии радиомодификаторов и в нормальных условиях инкубации, при действии только АраЦ, составляет $1,38 \pm 0,08$, а для комбинации агентов АраЦ+ГМ – $2,01 \pm 0,12$.

Репарация ДР при облучении клеток в обычных условиях происходит по экспоненциальной кинетике в отличие от условий влияния модификаторов. В последнем случае к 6 ч пострadiационной инкубации наблюдается некоторое возрастание количества ДР ДНК с последующим небольшим снижением к 24 ч наблюдения. При этом на всех временных интервалах уровень ДР ДНК в условиях комбинированного действия АраЦ+ГМ превышает уровень ДР при действии только АраЦ на ~20-25%. Уровень же повреждений через 24 ч превышает контрольный в ~5,4 и 7 раз для АраЦ и Арац+ГМ, соответственно.

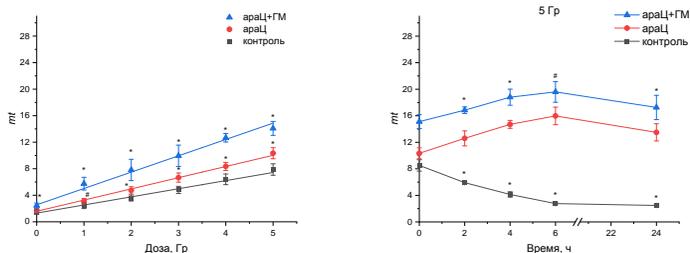


Рис. 1. Индукция и кинетика репарации ДР ДНК в клетках глиобластомы человека линии U87 при действии протонов *in vitro*, $p < 0,05$

На рисунке 2 приведены зависимости частоты образования ДР ДНК и кинетика их репарации в клетках меланомы мышей В16 при облучении рентгеновским излучением. Выход ДР ДНК при облучении клеток в условиях влияния АраЦ близок к наблюдаемым для клеток глиобластомы и величина ФИД так же составляет $1,38 \pm 0,08$, для комбинации АраЦ+SCR7 величина ФИД составляет $1,58 \pm 0,11$, что может указывать на меньший действующий эффект SCR7. Скорее всего это можно объяснить тем, что свое действие данный ингибитор будет проявлять на поздних, отдаленных стадиях репарации для чего требуется больший временной промежуток. Характер кинетики репарации ДР ДНК в клетках меланомы мышей аналогичен клеткам глиобластомы и как отдельный АраЦ, так и комбинация

АраЦ+SCR7 оказывают существенное модифицирующее влияние на формирование ДР ДНК в клетках В16. При этом эффективность комбинации АраЦ+SCR7 выше АраЦ на 10-15% и только через 24 ч на ~40%. Так же уровень повреждений через 24 ч превышает контрольный в ~5,8 и 10 раз.

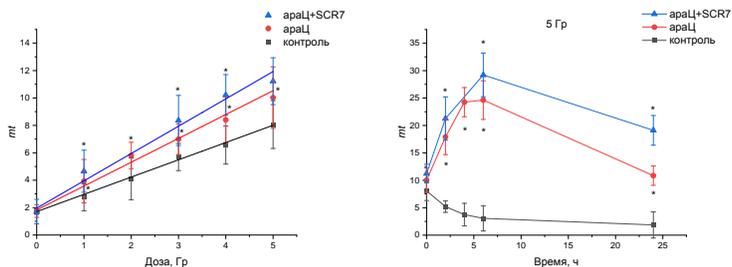


Рис. 2. Индукция и кинетика репарации ДР ДНК в клетках меланомы мышей линии В16 при действии рентгеновского излучения *in vitro*, $p < 0,05$

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении количества ДР ДНК, в присутствии АраЦ в исследуемых типах клеточных культур при действии протонов и рентгеновского излучения. Наиболее ярко радиосенсибилизирующий эффект действия АраЦ проявляется при его комбинированном воздействии с другими модификаторами. В условиях комбинированного действия модификаторов (АраЦ+SCR7 и АраЦ+ГМ) количество ДР ДНК существенно превышает количество ДР ДНК, формируемых только при действии ионизирующих излучений без использования модификаторов. Кинетика репарации ДР ДНК в культурах опухолевых клеток в условиях влияния различных ингибиторов синтеза ДНК имеет сложный характер и характеризуется увеличением выхода повреждений ДНК вплоть до 6 ч пострадиационной инкубации, после чего, количество повреждений начинает уменьшаться. Однако, даже спустя 24 ч после воздействия ионизирующего излучения количество ДР ДНК в условиях действия ингибиторов превышает контрольный уровень повреждений. Наблюдаемый эффект влияния АраЦ на увеличение выхода ДР ДНК может быть связан с образованием энзиматических ДР ДНК из других радиационных повреждений [5].

Репарация повреждений, формируемых ионизирующим излучением представляет из себя совокупность одновременно

протекающих, но разнонаправленных процессов: формирование энзиматических ДР из ОР и ПО за счет работы эксцизионной репарации оснований и репарации АП-сайтов, и репарации по пути негомологичного соединения концов как прямых ДР ДНК, так и формируемых ЭДР.

Комбинированное использование ингибиторов репарации ДНК и ионизирующих излучений может быть перспективным подходом для повышения радиочувствительности опухолевых клеток.

Список литературы

1. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ / А.В. Борейко [и др.] // Письма в ЭЧАЯ. – 2011. – Т. 4. – № 167. – С. 670-678.
2. Формирование прямых и энзиматических двунитевых разрывов ДНК в условиях влияния ингибиторов репарации при действии излучений разного качества / В.Н. Чаусов [и др.] // Письма в ЭЧАЯ. – 2018. – Т. 15. – № 6(218). – С. 573-588.
3. Incorporation of gemcitabine and cytarabine into DNA by DNA polymerase β and ligase III/XRCC1 / A.S. Prakasha Gowda [et al.] // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – № 23. – P. 4833-4840.
4. Harrison, L. Can DNA repair cause enhanced cell killing following treatment with ionizing radiation? / L. Harrison, S. Malyarchuk // *Pathophysiology*. – 2002. – Vol. 8. – № 3. – P. 149-159.
5. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на биологическую эффективность пучка протонов в модифицированном пике Брэгга / Е.А. Красавин [и др.] // Письма в ЭЧАЯ. – 2019. – Т. 2. – № 221. – С. 181-190.
6. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay / K. Końca [et al.] // *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2003. – Vol. 534. – № 1-2. – P. 15-20.