

P19-2005-166

А. В. Борейко, В. А. Тронов

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДУКЦИИ И РЕПАРАЦИИ
ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ
ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧНЫХ
ИОНОВ УГЛЕРОДА

Борейко А. В., Тронов В. А. P19-2005-166
Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК
в лимфоцитах человека при действии высокоэнергетичных ионов
углерода

С использованием метода ДНК-комет исследованы закономерности индукции двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках лимфоцитов человека при облучении различными дозами ускоренных ионов углерода с энергией 480 МэВ/нуклон (ЛПЭ = 10,6 кэВ/мкм) и γ -квантов ^{60}Co . Установлено, что зависимость выхода ДР как при действии γ -квантов, так и высокоэнергетичных ионов углерода линейно возрастает с дозой облучения. Биологическая эффективность ионов углерода по данному критерию облучения сравнима с действием γ -квантов. Исследована кинетика репарации ДР ДНК в лимфоцитах человека при действии указанных видов излучений. Выявлено, что репарация эффективно протекает в клетках, облученных как γ -квантами, так и высокоэнергетичными ионами углерода.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2005

Boreyko A. V., Tronov V. A. P19-2005-166
The Regularities of the Induction and Repair of DNA Double
Strand Breaks in Human Lymphocytes after Irradiation by Carbon
Ions with High Energy

The regularities of the induction of DNA double strand breaks (DSB) in human lymphocytes after irradiation by different doses of accelerated carbon ions (480 MeV/nucleon, LET = 10.6 keV/ μm) and γ -rays ^{60}Co by using of comet assay were investigated. It was shown that dependence of DSB formation increases linearly with growing of the dose of carbon ions and γ -rays. The biological effectiveness of carbon ions with high energy was similar to γ -rays. The kinetics of DSB reparation in human lymphocytes after irradiation by both carbon ions and γ -rays was studied. It is revealed that the reparation proceeds effectively with heavy ion and γ -ray irradiation.

The investigation has been performed at the Laboratory of Radiation Biology, JINR.

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2005

Двунитевые разрывы (ДР) ДНК относятся к наиболее тяжелым повреждениям генома. Они являются молекулярным субстратом формирования различного вида структурных мутаций генов, aberrаций хромосом, участвуют в инициации клеточной трансформации. ДР образуются при действии ионизирующих излучений, различных химических мутагенов и канцерогенов. Кроме того, они могут возникать в ходе репликации ДНК, когда репликативный комплекс встречает одонитевой разрыв, а также образуются как интермедиат в процессе сайт-специфической рекомбинации. Сведения, касающиеся закономерностей образования ДР ДНК в клетках различных организмов при действии высокоэнергетичных тяжелых ионов, крайне ограничены. Вместе с тем получение такого рода данных весьма актуально. Это обусловливается необходимостью решения ряда практических задач, стоящих перед космической радиобиологией, применением тяжелых заряженных частиц при лечении онкологических заболеваний, решением вопросов нормирования лучевых нагрузок на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений.

Установлено, что у клеток млекопитающих, так же как и у прокариот, облученных сверхлетальными и летальными дозами ионизирующих излучений, наблюдается линейная дозовая зависимость выхода ДР. Такой тип зависимости выявляется при использовании различных методов определения ДР ДНК [1, 2]. Их выход, согласно оценкам различных авторов, составляет $\sim 40\text{--}50 \text{ Гр}^{-1} \text{ геном}^{-1}$ (Blocher, 1982) и с увеличением ЛПЭ излучений частота образования ДР ДНК у клеток млекопитающих, так же как и у прокариот, возрастает до максимальных значений при ЛПЭ $\approx 200 \text{ кЭВ/мкм}$ [3, 4]. Большинство результатов, касающихся индукции ДР ДНК при облучении клеток заряженными частицами, получено с использованием ускоренных тяжелых ионов низких энергий. Вместе с тем представляется важным изучить закономерности образования ДР ДНК при облучении клеток тяжелыми заряженными частицами с энергиями, достигающими нескольких сотен МэВ/нуклон. Такие данные в литературе практически отсутствуют.

В настоящее время разрабатываются эффективные методы определения повреждений ДНК, позволяющие получить количественную информацию о закономерностях индукции и репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК. К ним, в частности, относится метод «ДНК-комет», который основан на электрофорезе ДНК индивидуальных клеток в постоянном электрическом поле. При наблюдении во флуоресцентном микроскопе геном отдельных клеток представляется в виде электрофоретического следа. Длина следа и доля в нем ДНК связаны с поврежденностью клеточной ДНК.

С учетом вышеизложенной задачи настоящего исследования явилось сравнительное изучение закономерностей индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках лимфоцитов человека при γ -облучении и действии ускоренных ионов углерода с энергией 480 МэВ/нуклон.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лимфоциты выделяли из свежей цельной гепаринизированной (15 ед./мл) донорской крови. Кровь (7–10 мл) смешивали с равным объемом питательной среды RPMI 1640 или фосфатного буфера (PBS) и осторожно, не нарушая границы раздела, наносили смесь на поверхность изотонического раствора фикола (фиколл + вибрографин, $\rho = 1,077$ г/мл). После центрифугирования при 800 g в течение 20 мин, отбирали интерфазу, содержащую лимфоциты. Клетки дважды отмывали в PBS, центрифугируя 5 мин при 400 g. Супернатант сливали, и полученный осадок разводили необходимым объемом среды или PBS, доводя концентрацию до $2 \cdot 10^6$ кл./мл.

Облучение γ -квантами проводили на установке «Рокус» (мощность дозы 0,3 Гр/с). Эксперименты с высокоэнергетичными ионами углерода (480 МэВ/нуклон, ЛПЭ = 10,2 кэВ/мкм) выполняли на ускорителе «Нуклотрон» Лаборатории высоких энергий им. В. И. Векслера и А. М. Балдина. Дозиметрию осуществляли, используя специально созданную установку с комплексом электронно-физической аппаратуры [5]. Облучение клеток проводили в пластиковых пробирках объемом 1,5 мл.

При облучении γ -квантами пробирки помещали в ледяную баню (0 °С) для ингибирования процессов репарации. Объем облучаемой суспензии на каждую дозу составлял 200 мкл. Клетки лимфоцитов ресуспендировали в питательной среде RPMI 1640. Объем облучаемой суспензии составлял от 200 до 800 мкл в зависимости от дозы облучения.

Из облученной и контрольной клеточной суспензии отбирали необходимые объемы для приготовления слайдов, а оставшуюся суспензию помещали в CO₂-термостат на 37 °С, предварительно добавив в RPMI 1640 эмбриональную телячью сыворотку (10%). Если облучение проводили в PBS, то его также заменяли на смесь RPMI 1640 с эмбриональной телячьей сывороткой, дважды отмыв клетки центрифугированием. Для изучения кинетики репарации из пробирок, выдерживаемых в термостате через определенные промежутки времени в течение 6 ч, периодически отбирали пробы для приготовления слайдов.

Для получения тонких гель-слайдов использовали предметные стекла, на поверхность которых была нанесена «подложка» (200 мкл нормальной 1% агарозы в H₂O), способствующая прилипанию слайда к стеклу [6]. На подложке не ранее чем за 1 ч готовили «подушку». Для этого на предметное

стекло наносили 150 мкл нормальной 1 %-й агарозы в PBS и накрывали покровным стеклом размером 24×24 мм, которое удаляли через 1–2 мин, и слайд убирали в холодильник до момента использования. Суспензию клеток смешивали при 37 °С с 1%-м раствором агарозы в PBS, имеющей низкую температуру затвердевания (low melting temperature agarose) в соотношении 1:2. Наносили на «подушку» 50 мкл приготовленной смеси и, накрыв малым покровным стеклом (18×18 мм), помещали слайд на лед. Через 2–5 мин покровное стекло осторожно удаляли. Полученные слайды опускали в емкость с лизирующим раствором (2,5 М NaCl; 0,1 М EDTA Na₂ — pH 10; 0,02 М Tris — pH 10; 1% X-100, 10% DMSO), установленную в холодильник. Лизис следует проводить в темноте.

Электрофорез нейтрально лизированных клеток проводили в низкосоле-вом ТАЕ-буфере (pH 8,3): 10 мМ Tris-HCl, 25 мМ EDTA Na₂. Для выравнивания солевой среды в геле слайд 2–3 раза ополаскивали в H₂O и помещали в камеру для электрофореза, заполненную ТАЕ-буфером и установленную в холодильнике. В таких условиях слайды выдерживали 40 мин для денатурации ДНК. Важно отметить, что воспроизводимость результатов в большой мере зависела от однородности электрического поля и качества электрофоретического буфера. Поэтому стекла со слайдами устанавливали плотно друг к другу, целиком заполняя электрофоретическую камеру, и каждый раз готовили свежий буфер. Электрофорез в нейтральных условиях проводили при напряжении 15 В в течение 40 мин. После электрофореза осторожно вынимали слайды из ТАЕ-буфера, укладывали их горизонтально на поднос, раскапывали на них щелочь по 400 мкл (0,3 М NaOH, 10 мМ EDTA Na₂) и выдерживали 15 мин в холодильнике (в темноте). Эта процедура необходима для осуществления деградации РНК, сильно затрудняющей детекцию комет. Осторожно сливали щелочь со слайдов и проводили нейтрализацию 0,4 М раствором Tris-HCl (pH 7,4), раскапывая его по 0,45–1,0 мл на каждый слайд. Данную процедуру повторяли трижды. После того как слайды хорошо высохли на воздухе (до появления сеточки кристаллов на их поверхности), их обрабатывали метанолом (15 мин) для окончательной дегидратации и фиксации ДНК.

Полученные слайды прокрашивали йодистым пропидием (PI). Для этого готовили смесь антифейда с 20 мМ Tris HCl (pH 7–8), в которой разводили PI до концентрации 6 мкг/мл. На слайд осторожно наносили 50–60 мкл краски и накрывали покровным стеклом (24×24 мм). Через 5–10 мин проводили измерения. Для регистрации изображений комет использовали флуоресцентный микроскоп «Axiolab» фирмы Carl Zeiss с цифровой Color chilled CCD-камерой фирмы Hamamatsu. С каждого слайда регистрировали 100–200 комет.

Сканирование каждой кометы давало профиль интенсивности ее флуоресценции, на котором легко идентифицируются голова и хвост кометы.

Обработку изображения кометы проводили с помощью программы CASP [7]. Каждую комету характеризовали общепринятым параметром — моментом хвоста кометы mt , являющимся произведением доли ДНК в хвосте (Ft) и его медианы (Xm) [6]. Параметры вычисляли по формулам:

$$\begin{aligned} mt &= Xm \cdot Ft, \\ Xm &= \left[\sum_t (Ii \cdot Xi) \right] / \sum_t Ii, \\ Ft &= \left(\sum_t Ii \right) / \left(\sum_c Ii \right). \end{aligned} \quad (1)$$

Здесь Ii — интенсивность флуоресценции в точке i ; Xi — расстояние от медианы головы кометы до точки i . Индексы под знаком суммы обозначают область суммирования: t — суммирование проводится только в пределах хвоста кометы, c — суммирование в пределах всей кометы.

Результаты измерений переводили в Excel-таблицу, на основании которой рассчитывали среднее значение (\bar{x}) и стандартное отклонение ($STDEV$):

$$STDEV = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}, \quad (2)$$

где n — число измерений.

Графики и гистограммы строили с помощью программы OriginPro70.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены зависимости индукции двунитевых разрывов ДНК от дозы γ -квантов и ускоренных ионов углерода. Видно, что для обоих видов излучений зависимость выхода ДР от дозы облучения описывается линейной функцией. Линейный характер зависимости выхода ДР ДНК от дозы облучения был получен и другими авторами, использовавшими различные методы определения ДР ДНК [1, 2]. Выход ДР ДНК у клеток млекопитающих примерно в 25 раз меньше, чем одностранных разрывов (ОР). Если облучение дозой 1 Гр в геноме клеток млекопитающих вызывает образование $\sim 10^3$ ОР, то выход ДР ДНК составляет ~ 40 – 50 разрывов/Гр/геном [1]. Как можно видеть из представленных на рис. 1 данных, выход ДР ДНК, определяемый с помощью использованного нами метода «ДНК-комет», соответствует полученным ранее результатам по выходу ДР ДНК авторами, использовавшими другие методы определения двунитевых разрывов.

Биологическая эффективность ионов углерода, как это видно из представленных на рис. 1 данных, близка к наблюдаемой при γ -облучении. С увеличением ЛПЭ излучений частота образования ДР как у прокариот, так

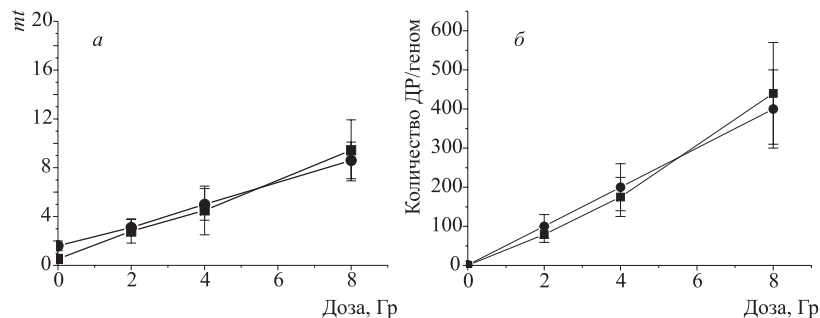


Рис. 1. Индукция двуниевых разрывов ДНК в клетках лимфоцитов крови человека при облучении γ -квантами ^{60}Co (—●—) и ускоренными ионами углерода ^{12}C (—■—) с энергией 480 МэВ/нуклон. а — зависимость параметра mt от дозы облучения, б — зависимость количества ДР ДНК на геном от дозы облучения

и у клеток млекопитающих возрастает до максимальных значений при ЛПЭ ≈ 200 кэВ/мкм [4, 8–10]. В наших экспериментах мы использовали ускоренные ионы углерода высоких энергий. Величина ЛПЭ частиц в этом случае составляла 10,6 кэВ/мкм. В характере зависимости выхода ДР ДНК от ЛПЭ частиц в этой области ЛПЭ излучений, реализуемых легкими заряженными частицами с низкой энергией, выявляются коэффициенты ОБЭ, близкие к 1. Наши результаты, полученные с использованием высокоэнергетических ионов углерода, обладающих сравнительно малыми значениями ЛПЭ, также свидетельствуют о том, что ионы углерода индуцируют ДР ДНК с эффективностью, близкой к γ -облучению клеток.

На рис.2 приведены данные о кинетике репарации ДР ДНК при γ -облучении дозой 80 Гр и действии ионов углерода высоких энергий в дозе 6 Гр. Как можно видеть из представленных материалов, кривые, описывающие кинетику репарации ДР ДНК, при γ -облучении и действии высокоэнергетических ионов близки между собой.

В экспериментах ряда авторов было показано, что у различных типов клеток млекопитающих репарация ДР проходит эффективно как в ростовых, так и в не ростовых условиях по монофазной или бифазной кинетике [11–14]. Например, на клетках мышей и асцитной карциномы Эрлиха [15] в пострадиационный период выявлено, что репарация ДР происходит по экспоненциальной кинетике независимо от дозы облучения. В ряде работ была продемонстрирована независимость скорости репарации ДР от фазы клеточного цикла [4, 13]. Наряду с этим имеются свидетельства зависимости скорости и объема репарации ДР от клеточного цикла [11]. Авторы полагают, что реализуются два пути репарации ДР ДНК: один из них осуществляется, главным образом, в поздней S-фазе, другой — на протяжении всего клеточного цикла.

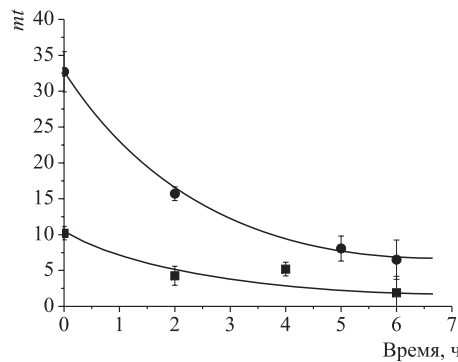


Рис. 2. Кинетика репарации ДР ДНК при γ -облучении (● — γ -кванты, 80 Гр) и действии ионов ускоренных ионов углерода (■ — ^{12}C , 6 Гр) с энергией 480 МэВ/нуклонов

При действии ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ данные о скорости репарации ДР клетками эукариот противоречивы. Имеются сведения, что репарация протекает с одинаковой скоростью [16] или замедлена [14] по сравнению с воздействием редкоионизирующих излучений. Анализ полученных нами материалов, представленных на рис. 2, свидетельствует о том, что репарация ДР ДНК протекает по экспоненциальной кинетике и значительная часть ДР после облучения клеток γ -квантами в дозе 80 Гр восстанавливается спустя 4–6 ч. При действии ускоренных ионов углерода дозой облучения, равной 6 Гр, репарация ДР ДНК в облученных клетках осуществляется также эффективно. Видно, что кинетические кривые репарации ДР имеют сходный характер, что может объясняться низкими значениями ЛПЭ ионов углерода с энергией 480 МэВ/нуклон.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что биологическая эффективность высокоэнергетичных ионов углерода, выявленная по критерию индукции двунитевых разрывов ДНК, и «стандартного» вида ионизирующего излучения — γ -квантов ^{60}Co — одинакова. Репарация ДР ДНК в лимфоцитах периферической крови человека эффективно осуществляется как при γ -облучении, так и при действии высокоэнергетичных ионов углерода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blocher D. // Int. J. Radiat. Biol. 1982. V. 42. P. 317–328.
2. Van der Schans O. P., Paterson M. C., Cross W. G. // Int. J. Radiat. Biol. 1983. V. 44. P. 75–85.
3. Kampf G., Eichhorn K. // Stud. Biophys. 1983. V. 93. P. 17–26.

4. *Blocher D., Niissem K., Bryant P.E.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1983. V. 43. P. 579–584.
5. Тимошенко Г. Н. Радиометрия нуклонов в полях излучений, генерируемых ускорителями тяжелых заряженных частиц. Автореф. дисс. докт. физ.-мат. наук. Дубна, 2005.
6. Тронов В. А., Пелевина И. И. // *Цитология*, 1996. Т. 38. С. 427–439.
7. *Konca K. et al.* // *Mutat. Res.* 2003. V. 534. P. 15–20.
8. *Christensen R. C., Tobias C. A., Taylor W. D.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1972. V. 22, No. 5. P. 457–477.
9. *Frankenberg D. et al.* // *Radiat. Res.* 1981. V. 88. P. 524–532.
10. *Kampf G., Eichhorn K.* // *Stud. Biophys.* 1983. V. 93. P. 17–26.
11. *Radford I. R.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1987. V. 52. P. 555–563.
12. *Van Ankeren S. C., Murray D., Meyn R. E.* // *Radiat. Res.* 1988. V. 16. P. 1–525.
13. *Metzger L., Iliakis O.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1991. V. 59. P. 1325–1341.
14. *Peak M. J. et al.* // *Radiat. Biol.* 1991. V. 60. P. 891–898.
15. *Blocher D., Pohlit W.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1982. V. 42. P. 329–338.
16. *Maki H. et al.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1986. V. 50. P. 795–810.

Получено 25 октября 2005 г.

Редактор *М. И. Зарубина*

Подписано в печать 15.12.2005.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,44. Уч.-изд. л. 0,55. Тираж 220 экз. Заказ № 55150.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@pds.jinr.ru

www.jinr.ru/publish/