

P19-2007-192

В. Н. Чаусов, А. В. Борейко, Е. А. Красавин, А. В. Можаяева,
И. И. Равначка, С. И. Тиунчик, В. А. Тронов

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИНДУКЦИИ И РЕПАРАЦИИ
ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ
ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ УСКОРЕННЫХ ТЯЖЕЛЫХ
ИОНОВ РАЗЛИЧНЫХ ЭНЕРГИЙ**

Направлено в журнал «Радиационная биология. Радиоэкология»

Чаусов В. Н. и др.

P19-2007-192

Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии ускоренных тяжелых ионов различных энергий

С использованием метода ДНК-комет исследованы закономерности индукции двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках лимфоцитов человека при облучении различными дозами ускоренных ионов лития и углерода с энергией 33 и 480 МэВ/нуклон и линейной передачей энергии (ЛПЭ), равной 20 и 10,2 кэВ/мкм соответственно, и γ -квантов ^{60}Co . Установлено, что зависимость выхода ДР при действии как γ -квантов, так и высокоэнергетичных ионов лития и углерода линейно возрастает с дозой облучения. Биологическая эффективность ионов углерода по данному критерию облучения сравнима с действием γ -квантов, а частицы лития обладают большей биологической эффективностью по сравнению с γ -облучением, и величина относительной биологической эффективности (ОБЭ) ионов лития составляет $1,6 \pm 0,1$. 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 лития и углерода по экспоненциальной кинетике.

Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2007

Chausov V. N. et al.

P19-2007-192

The Regularities of the Induction and Reparation of DNA Double Strand Breaks in Human Lymphocytes after Irradiation with Accelerated Heavy Ions of Different Energy

The regularities of the induction of DNA double strand breaks (DSB) in human lymphocytes after irradiation with different doses of accelerated lithium and carbon ions (33 and 480 MeV/nucleon, LET = 20 and 10.2 keV/ μm , respectively) 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 lithium and carbon ions and γ -rays. The biological effectiveness of carbon ions with high energy was similar to γ -rays, lithium ions possess greater biological effectiveness in comparison with γ -rays and value of RBE of lithium ions amount to 1.6 ± 0.1 . The kinetics of DSB reparation in human lymphocytes after irradiation with lithium and carbon ions and γ -rays was studied. It is revealed that the reparation proceeds effectively with heavy-ion and γ -ray irradiation by exponential kinetics.

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

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2007

Изучение закономерностей и механизмов образования двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках человека при действии тяжелых заряженных частиц с разными физическими характеристиками является весьма важной задачей при решении проблем радиационной генетики, космической радиобиологии, радиационной медицины. ДР, как известно, относятся к наиболее тяжелым повреждениям генома и являются молекулярным субстратом формирования различного вида структурных мутаций генов, aberrаций хромосом, участвуют в инициации клеточной трансформации. Данные о закономерностях образования ДР ДНК в клетках человека при облучении тяжелыми ионами ограничены и в наибольшей степени касаются действия тяжелых заряженных частиц с высокими величинами линейной передачи энергии (ЛПЭ). Вместе с тем представляются важными исследования закономерностей формирования ДР ДНК при действии тяжелых заряженных частиц со сравнительно низкими значениями ЛПЭ в диапазоне 10–20 кэВ/мкм. Особый интерес вызывает изучение закономерностей индукции ДР, когда указанные величины ЛПЭ реализуются частицами, обладающими разной массой и энергией. С учетом этого в задачу настоящего исследования входило изучение закономерностей индукции ДР ДНК в лимфоцитах периферической крови человека при действии ускоренных ионов лития и углерода, различающихся по величине энергии более чем на порядок, но не имеющих столь больших различий в величине ЛПЭ. В наших экспериментах использовали ускоренные ионы лития и углерода с энергией 33 и 480 МэВ/нуклон и ЛПЭ, равной 20 и 10,2 кэВ/мкм соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Лимфоциты выделяли из свежей цельной гепаринизированной (15 ед./мл) донорской крови. Кровь смешивали с равным объемом питательной среды RPMI 1640 или фосфатного буфера (PBS) и наносили смесь на поверхность изотонического раствора фиколла (фиколл + вирографин, $\rho = 1,077$ 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 [1]. Клетки облучали в пластиковых пробирках объемом 1,5 мл.

Облучение ионами лития проводили на ускорителе тяжелых ионов У-400М Лаборатории ядерных реакций им. Г. Н. Флерова ОИЯИ на установке «Геном» для облучения биологических объектов [2]. Облучаемые клетки находились в специально сконструированных чашках глубиной 4 мм и внутренним диаметром 12 мм, выполненных из органического стекла. Чашки закрывали поликарбонатной пленкой толщиной 8 мкм. Размеры чашек определялись диаметром генерируемого ускорителем пучка ионов, равного 15 мм, и пробегом частиц в облучаемой среде. Для устранения влияния краевых эффектов чашки имели меньший диаметр, чем размер пучка ионов. Чашки с пробами лимфоцитов закреплялись в диске-контейнере, с помощью которого по заданной программе пробы вводились в зону облучения. Мощность дозы облучения составляла 1,5 Гр/мин.

При облучении γ -квантами пробирки помещали в ледяную баню (0 °С) для ингибирования процессов репарации. Объем облучаемой суспензии на каждую дозу составлял 200 мкл. При облучении на нуклотроне 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%-й агарозы в H₂O), способствующая прилипанию слайда к стеклу [3]. На подложке готовили «подушку». Для этого на предметное стекло наносили 150 мкл нормальной 1%-й агарозы в PBS и накрывали покровным стеклом, 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 при-

готовленной смеси и, накрыв покрывным стеклом, помещали слайд на лед. Через 2–5 мин покрывное стекло осторожно удаляли. Полученные слайды опускали в емкость с лизирующим раствором (2,5 моль NaCl; 0,1 моль EDTA Na₂ — pH 10; 0,02 моль Tris — pH 10; 1 % X-100, 10 % DMSO), установленную в холодильник. Лизис проводили в темноте.

Электрофорез нейтрально лизированных клеток проводили в низкосоле-вом ТАЕ-буфере (pH 8,3): 10 ммоль Трис-НСl, 25 ммоль EDTA Na₂. Для выравнивания солевой среды в геле слайд 2–3 раза ополаскивали в Н₂O 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, полностью заполняя электрофоретическую ванну в поперечнике, 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, раскапывали на них щелочь по 400 мкл (0,3 моль NaOH, 10 ммоль ЭДТА Na₂) и выдерживали 15 мин в холодильнике (в темноте). Эта процедура необходима для осуществления деградации РНК, сильно затрудняющей детекцию комет. Нейтрализацию проводили 0,4 моль раствором Tris — HCl (pH 7,4), раскапывая его по 0,45–1,0 мл на каждый слайд. Данную процедуру повторяли трижды. Просушенные на воздухе слайды обрабатывали метанолом (15 мин) для окончательной дегидратации и фиксации ДНК.

Полученные слайды прокрашивали иодистым пропидием (PI). 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 [4]. Каждую комету характеризовали общепринятым параметром — моментом хвоста кометы mt , являющимся произведением доли ДНК в хвосте (Ft) и его медианы (Xm) [3]. 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 Excell-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 OriginPro.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены дозовые зависимости частоты образования двуни-тевых разрывов ДНК после облучения γ -квантами и высокоэнергетичными ионами углерода. Видно, что для обоих видов излучений с увеличением дозы выход ДР ДНК линейно возрастает. В ранее выполненных разными авторами исследованиях установлено, что у клеток млекопитающих, также как и у прокариот, облученных сверхлетальными и летальными дозами ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками, наблюдается линейная дозовая зависимость выхода ДР. Такой тип зависимости выявляется при использовании различных методов определения ДР ДНК [5–7]. Выход ДР ДНК у клеток млекопитающих примерно в 25 раз меньше, чем одонитевых разрывов (ОР). Если облучение дозой 1 Гр в геноме клеток млекопитающих вызывает образование $\sim 10^3$ ОР [8], то выход ДР ДНК составляет $\sim 40 - 50$ разрывов/Гр/геном [5]. Как можно видеть из представленных данных, выход ДР

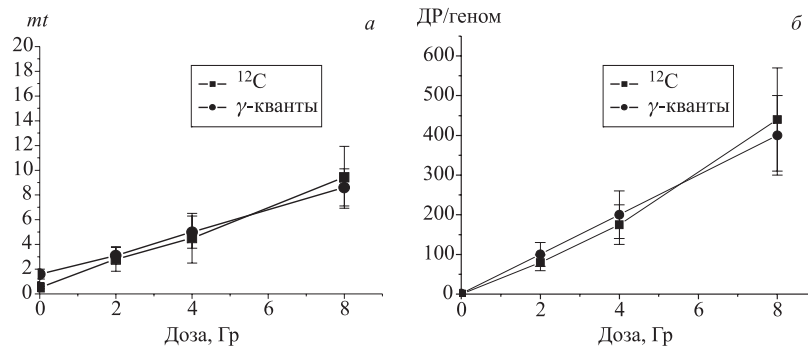


Рис. 1. Индукция двуни-тевых разрывов ДНК в клетках лимфоцитов крови человека при облучении γ -квантами ^{60}Co и ускоренными ионами углерода с энергией 480 МэВ/нуклон. а — зависимость параметра mt от дозы облучения; б — зависимость количества ДР ДНК на геном от дозы облучения

ДНК, определяемый с помощью использованного нами метода ДНК-комет, соответствует полученным ранее другими авторами результатам выхода ДР ДНК, использовавшими другие методы определения двунитевых разрывов.

Биологическая эффективность ионов углерода, как это следует из данных на рис. 1, близка к наблюдаемой при γ -облучении. В работах [9–12] показано, что с увеличением ЛПЭ излучений частота образования ДР у клеток различного происхождения возрастает до максимальных значений при ЛПЭ ≈ 200 кэВ/мкм. Зависимость выхода ДР ДНК от ЛПЭ частиц в области ЛПЭ излучений, реализуемых легкими заряженными частицами с низкой энергией, характеризуется коэффициентами относительной биологической эффективности (ОБЭ) частиц, близких к единице. В наших экспериментах использовались ускоренные ионы углерода высоких энергий с величиной ЛПЭ, равной 10,2 кэВ/мкм, и полученные данные также свидетельствуют о том, что ионы углерода индуцируют ДР ДНК с эффективностью, наблюдаемой при γ -облучении клеток.

На рис. 2 приведены дозовые зависимости частоты образования двунитевых разрывов при облучении ускоренными ионами лития. Как можно видеть, тяжелые заряженные частицы обладают большей биологической эффективностью по сравнению с γ -облучением. Величина ОБЭ частиц, рассчитанная как $ОБЭ = D_{\gamma}/D_{Li}$, где D_{γ}/D_{Li} — отношение доз, индуцирующих равные эффекты при γ -облучении и облучении тяжелыми ионами, составляет $1,6 \pm 0,1$. Полученные данные свидетельствуют о том, что низкоэнергетичные ионы лития с ЛПЭ, равной 20 кэВ/мкм, обладают весьма высокой биологической эффективностью по сравнению с γ -квантами. Действительно, как это следует из данных, полученных в [11, 12], 15–30 кэВ/мкм является той областью значений ЛПЭ, при которых начинается заметное увеличение выхода двунитевых разрывов ДНК по сравнению с γ -квантами.

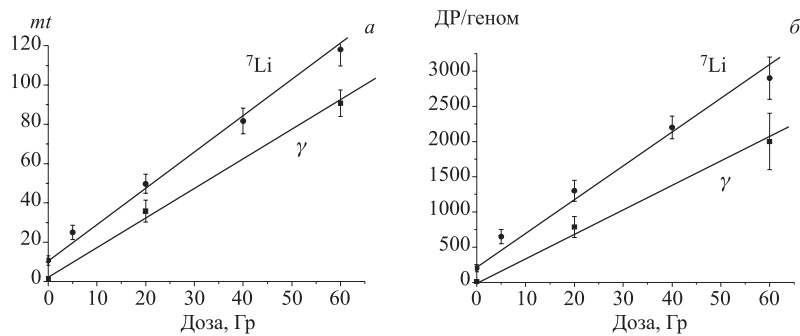


Рис. 2. Индукция двунитевых разрывов ДНК в клетках лимфоцитов крови человека при облучении γ -квантами ^{60}Co и ускоренными ионами лития с энергией 33 МэВ/нуклон. *a* — зависимость параметра *mt* от дозы облучения; *b* — зависимость количества ДР ДНК на геном от дозы облучения

На рис. 3 приведены данные о кинетике репарации ДР ДНК при действии различных доз γ -квантов, ионов лития и углерода. Видно, что кривые, описывающие кинетику репарации ДР ДНК при этих воздействиях, имеют экспоненциальный вид. Значительная часть всех индуцируемых повреждений восстанавливается клетками спустя 6 ч после облучения. Ранее было показано [13–16], что у различных типов клеток млекопитающих репарация ДР после лучевого воздействия проходит эффективно как в ростовых, так и в не ростовых условиях по монофазной или бифазной кинетике. Например, на клетках мышей и асцитной карциномы Эрлиха [17] в пострadiaционный 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 [15, 18]. Наряду с этим имеются свидетельства зависимости скорости и объема репарации ДР от клеточного цикла [13]. 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.

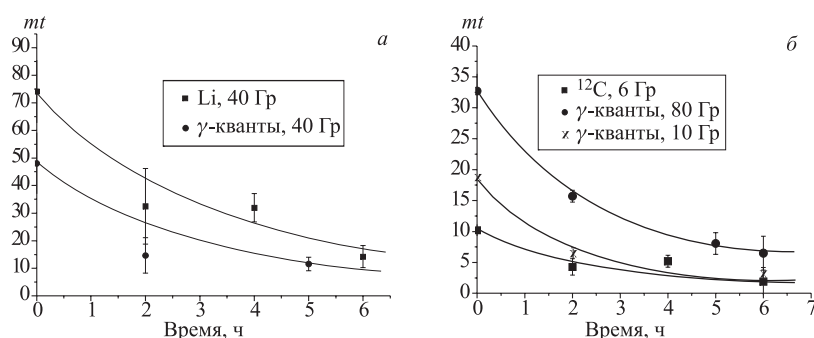


Рис. 3. Кинетика репарации ДР ДНК при γ -облучении и действии ускоренных ионов лития (а) и углерода (б)

При действии ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ данные о скорости репарации ДР клетками эукариот противоречивы. Имеются сведения, что репарация протекает с одинаковой скоростью [19] или замедлена [16] по сравнению с воздействием редкоионизирующих излучений. Анализ полученных нами материалов свидетельствует о том, что репарация ДР ДНК протекает по экспоненциальной кинетике и значительная часть ДР после облучения клеток γ -квантами и ускоренными тяжелыми ионами различных энергий восстанавливается спустя 4–6 ч.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что биологическая эффективность высокоэнергетичных ионов углерода с низкими значениями ЛПЭ, выявленная по критерию индукции двуниевых разрывов ДНК, практически одинакова со «стандартным» видом ионизирующего из-

лучения — γ -квантами ^{60}Co . Низкоэнергетичные ионы лития с большими значениями ЛПЭ обладают более высокой биологической эффективностью по сравнению с γ -квантами. Двукратное возрастание величины ЛПЭ частиц в последнем случае сопровождается заметным увеличением выхода ДР ДНК в облученных клетках. Репарация ДР ДНК в лимфоцитах периферической крови человека эффективно осуществляется как при γ -облучении, так и при действии ускоренных тяжелых ионов с разными физическими характеристиками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тимошенко Г. Н. Радиометрия нуклонов в полях излучений, генерируемых ускорителями тяжелых заряженных частиц: Автореф. дис... докт. физ.-мат. наук. Дубна, 2005.
2. Череватенко А. П. Физико-дозиметрическая установка «Геном» для проведения радиобиологических экспериментов на пучках тяжелых ионов циклотрона У-200 ОИЯИ // Тр. рабочего совещ. по генетическому действию корпускулярных излучений. Дубна, 1989. С. 300–303.
3. Тронов В. А., Пелевина И. И. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принцип и применение метода // Цитология. 1996. Т. 38. С. 427–439.
4. Konca K. et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // Mutat. Res. 2003. V. 534. P. 15–20.
5. Blocher D. DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X-rays. Determination of induced breaks by centrifugation at reduced speed // Int. J. Radiat. Biol. 1982. V. 42. P. 317–328.
6. Van der Schans G. P., Centen H. B. Progress in Mutation Research. V. 4. Amsterdam: Elsevier, 1982. P. 285–299.
7. McMillan T. J. et al. The relationship of DNA double-strand break induction to radiosensitivity in human tumour cell lines // Int. J. Radiat. Biol. 1990. V. 58. No. 3. P. 427–438.
8. Christensen R. C., Tobias C. A., Taylor W. D. Heavy-ion-induced single- and double-strand breaks in ϕ X-174 replicative form DNA // Int. J. Radiat. Biol. 1972. V. 22, No. 5. P. 457–477.
9. Frankenberg D. et al. Evidence for DNA double strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely and densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions // Radiat. Res. 1981. V. 88. P. 524–532.

10. *Kampf G., Eichhorn K.* DNA strand breakage by different radiation qualities and relations to cell killing: Further results after the influence of α -particles and carbon ions // *Stud. Biophys.* 1983. V. 93. P. 17–26.
11. *Blocher D.* DNA double-strand break repair determines the RBE of α -particles // *Int. J. Radiat. Biol.* 1988. V. 54. P. 761–771.
12. *Radford I.R.* Effect of cell-cycle position and dose on the kinetics of DNA double-strand breakage repair in X-irradiated Chinese hamster cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1987. V. 52. P. 555–563.
13. *Van Ankeren S. C., Murray D., Meyn R. E.* Induction and rejoining of γ -ray induced DNA single and double-strand breaks in Chinese hamster AA8 cells and in two radiosensitive clones // *Radiat. Res.* 1988. V. 16. P. 1–525.
14. *Metzger L., Iliakis O.* Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle as assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1991. V. 59. P. 1325–1341.
15. *Peak M. J. et al.* Comparison of repair of DNA double-strand breaks caused by neutron or gamma radiation in cultured human cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1991. V. 60. P. 891–898.
16. *Blocher D., Pohlit W.* DNA double-strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X-rays. Can cell death be attributed to double-strand breaks? // *Int. J. Radiat. Biol.* 1982. V. 42. P. 329–338 .
17. *Blocher D., Nüssem N., Bryant P. E.* Kinetics of double-strand break repair in the DNA of irradiated synchronized mammalian cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 1983. V. 43. P. 579–584.
18. *Maki H. et al.* Cell inactivation and DNA single and double-strand breaks in cultured mammalian cells irradiated by a thermal neutron beam // *Int. J. Radiat. Biol.* 1986. V. 50. P. 795–810.

Получено 26 декабря 2007 г.

Редактор *Е. В. Сабеева*

Подписано в печать 29.01.2008.

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

Усл. печ. л. 0,68. Уч.-изд. л. 0,81. Тираж 230 экз. Заказ № 56036.

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

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/