

ФОРМИРОВАНИЕ ПРЯМЫХ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИХ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ РЕПАРАЦИИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ РАЗНОГО КАЧЕСТВА

*В. Н. Чаусов^{a, 1}, А. В. Борейко^{a, б}, Т. С. Буланова^{a, б}, М. Г. Заднепрянец^{a, б},
Е. В. Ильина^a, Л. Йежкова^a, Е. А. Красавин^{a, б}, Р. А. Кожина^{a, б},
Е. А. Кузьмина^{a, б}, Е. А. Куликова^{a, б}, Е. В. Смирнова^{a, б}, С. И. Тиунчик^a*

^a Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

^б Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия

С использованием методов ДНК-комет и иммуноцитохимического окрашивания изучены закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках человека при облучении γ -квантами ^{60}Co и ускоренными тяжелыми ионами с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) в условиях влияния ингибиторов репарации ДНК: арабинозидцитозина и гидроксимочевины. Показано, что при действии ускоренных тяжелых ионов модифицирующее действие агентов уменьшается с ростом ЛПЭ частиц. Использованный подход с применением ингибиторов синтеза ДНК позволяет оценить относительный вклад энзиматических ДР ДНК в суммарный выход ДР при действии ионизирующих излучений разного качества.

With the use of the DNA comet assay and immunocytochemical staining, regularities have been studied in the induction and repair of DNA double-strand breaks (DSBs) in human cells after exposure to ^{60}Co γ -rays and accelerated heavy ions with different linear energy transfer (LET) in the presence of the DNA repair inhibitors cytosine arabinoside and hydroxyurea. It is shown that for heavy ions the agents' modifying effect decreases with increasing particles' LET. The approach involving DNA synthesis inhibitors used in this study allows an estimation of the proportion of enzymatic DNA DSBs in total DSB yield after exposure to ionizing radiations of different quality.

PACS: 87.53.-j; 87.19.La; 87.14.Gg

Как известно, при действии ионизирующих излучений в ДНК клеток формируется широкий спектр различных повреждений. Наиболее тяжелыми нарушениями генетических структур, приводящими к клеточной гибели, формированию поломок хромосом, инициации злокачественной трансформации клеток, являются одновременные нарушения целостности двух нитей ДНК — двунитевые разрывы (ДР) [1, 2]. Двунитевые разрывы

¹E-mail: chausov@jinr.ru

образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков — прямые ДР (ПДР) — вследствие передачи энергии локальному участку ДНК и приводящего к нарушению ее целостности, либо могут формироваться из других повреждений в процессе клеточного восстановления как «издержки репарации» в процессе работы репарационных ферментов. Этот тип повреждений относится к разряду энзиматических ДР (ЭДР) [3, 4].

При действии излучений с возрастающими величинами линейных передач энергии (ЛПЭ) наблюдаются изменения в спектре индуцируемых повреждений ДНК клеток. При низких значениях ЛПЭ с наибольшей частотой формируются повреждения оснований и одностранные разрывы (ОР) ДНК. При облучении тяжелыми заряженными частицами с высокими значениями ЛПЭ образуются преимущественно двустранные разрывы, главным образом типа ПДР, а количество одностранных разрывов снижается. Ранее мы показали [5], что при использовании ингибиторов репаративного синтеза ДНК 1- β -D-арабинофуранозилцитозина (АраЦ) и гидроксимочевины (ГМ) в клетках, облученных γ -квантами и частицами с высокой ЛПЭ, в разной степени модифицируется выход ДР ДНК в пострadiационный период. При γ -облучении в условиях влияния модифицирующих агентов выход ДР ДНК значительно возрастал в ходе пострadiационной инкубации лимфоцитов. В то же время при действии ускоренных ионов бора модифицирующее действие агентов было меньшим. Установлено, что при γ -облучении клеток в присутствии АраЦ и ГМ происходит накопление разрывов в нитях ДНК [6]. АраЦ представляет собой эффективный ингибитор ДНК полимеразы α и в меньшей степени β , ведущих репаративный синтез ДНК [7, 8]. Гидроксимочевина, являясь ингибитором рибонуклеотидредуктазы, влияет на внутриклеточный пул нуклеотидов, в частности цитозина, и снижает его [9]. В результате этого происходит длительная фиксация возникающих прямых одностранных разрывов ДНК либо ОР, формирующихся в ходе эксцизионной репарации. Такие повреждения могут являться сайтами формирования ЭДР ДНК в результате атаки нити, оппозитной поврежденному участку, эндонуклеазами типа S_1 [10–12]. С учетом этого высокие коэффициенты модификации выхода ДР ДНК при γ -облучении клеток и низкие при действии тяжелых заряженных частиц находят свое объяснение.

В наших предыдущих сравнительных экспериментах по индукции ДР ДНК γ -квантами и тяжелыми заряженными частицами в присутствии ингибиторов репарации ДНК использовались ускоренные ионы бора с относительно невысокими значениями ЛПЭ (40 кэВ/мкм). При этих значениях ЛПЭ частиц выход прямых ДР не достигает максимальных величин, так же как не происходит и существенного снижения выхода ОР ДНК, что наблюдается при значительно более высоких ЛПЭ (например, 150 и 200 кэВ/мкм) [13, 14]. При таких значениях ЛПЭ ионов можно ожидать меньшего вклада ЭДР ДНК в суммарный выход ДР, а следовательно, и меньшего модифицирующего влияния ингибиторов репарации ДНК в радиационно-индуцированный эффект. С учетом этого в настоящей работе было предпринято изучение влияния АраЦ и ГМ на выход двустранных разрывов при действии тяжелых заряженных частиц со значительно большими величинами ЛПЭ (вплоть до 160 кэВ/мкм). Для оценки модифицирующего влияния ингибиторов репарации ДНК на выход ДР при действии ионизирующих излучений разного качества был использован не только метод ДНК-комет, но и иммуноцитохимический метод, позволяющий визуализировать радиационно-индуцированные фокусы в генетических структурах клеток.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В работе использовались лимфоциты периферической крови и нормальные фибробласты кожи человека. Для выявления степени поврежденности ДНК и определения выхода ДР ДНК в лимфоцитах был использован метод ДНК-комет с некоторыми модификациями [5, 15]. Для количественной оценки частоты образования ДР ДНК в отдельных ядрах клеток и их визуализации при действии разных типов излучений в обычных условиях и в присутствии модифицирующих агентов был использован иммуноцитохимический метод определения фокусов γ H2AX/53BP1 [16].

Выделение лимфоцитов. Лимфоциты выделяли из свежей цельной гепаринизированной (15 ед./мл) донорской крови, смешанной с равным объемом фосфатного буфера (ФБ) pH 7,4 («ПанЭко», Россия). Суспензию клеток наносили на поверхность фиколла ($\rho = 1,077$ г/мл, «ПанЭко», Россия). После центрифугирования отбирали интерфазный слой градиента, содержащий лимфоциты, и дважды отмывали в ФБ центрифугированием. Супернатант сливали и полученный осадок разводили в PRMI 1640 («ПанЭко», Россия) с эмбриональной телячьей сывороткой (10 % v/v) до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Клеточная культура. Нормальные фибробласты кожи человека (NHDF 22873, Lonza, CC-2509) культивировали в среде IMDM (Sigma-Aldrich, Германия) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, Германия) и 1%-го раствора гентамицин-глутамин (Sigma-Aldrich, Германия) в пластиковых флаконах с площадью поверхности роста 25 см² (Corning, США) при 37 °С и 5%-м содержании CO₂ в атмосфере. Для всех экспериментов использовали клетки на 9–12-м пассажах. За 16–18 ч до облучения 300 мкл клеточной суспензии наносили на покровные стекла диаметром 14 мм и толщиной 0,17 мм, размещенные в пластиковых чашках Петри диаметром 35 мм (MatTek Corporation, P35G-0.170-14-C, США). После 2-ч инкубации к прикрепившимся клеткам добавляли 3,5 мл среды для культивирования.

За 1 ч до облучения к суспензии лимфоцитов и в культуральную среду фибробластов добавляли АраЦ (Sigma-Aldrich, Германия) и ГМ (Sigma-Aldrich, Германия) в конечной концентрации 20 мкмоль и 2 ммоль соответственно, после чего клетки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 1 ч.

Облучение. Облучение γ -квантами ⁶⁰Со проводили на установке «Рокус-М» Лаборатории ядерных проблем им. В. П. Дзельцова ОИЯИ с мощностью дозы 0,8 Гр/мин.

Облучение ускоренными ионами ¹¹B и ¹⁵N с разными физическими характеристиками (табл. 1) проводили на установке «Геном-М» [17] на ускорителе У-400М Лаборатории ядерных реакций им. Г. Н. Флерова ОИЯИ. Лимфоциты облучали в специально сконструированных чашках глубиной 4 мм и внутренним диаметром 12 мм, выполнен-

Таблица 1. Физические характеристики использованных в экспериментах ускоренных ионов

Частицы	Энергия, МэВ/нуклон	ЛПЭ, кэВ/мкм	Мощность дозы, Гр/мин
¹¹ B	33,4	44	15
¹¹ B	14	89	15
¹¹ B	9	127	15
¹⁵ N	43	71	10
¹⁵ N	15	160	10

ных 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 рассеивания ионов чашки имели меньший диаметр, чем пучок ионов. Чашки с пробами лимфоцитов закреплялись в диске-контейнере, с помощью которого по заданной программе пробы вводились в зону облучения.

До и после облучения на ускорителе У-400М и на установке «Рокус-М» все образцы с суспензией лимфоцитов находились в термokonтейнере при температуре 4 °С для ингибирования процессов репарации. Объем облучаемой суспензии на каждую дозу составлял 200 мкл.

После облучения из облученной и контрольной суспензий отбирали необходимые объемы для приготовления слайдов, а оставшуюся суспензию помещали в CO₂-термостат с температурой 37 °С. Для изучения кинетики репарации из пробирок, выдерживаемых в термостате, каждые 2 ч в течение 6 ч отбирали пробы для приготовления слайдов.

Фибробласты кожи человека облучали ускоренными ионами ¹⁵N ($E = 35$ МэВ/нуклон и ЛПЭ = 81,5 кэВ/мкм) с мощностью дозы ~ 2 Гр/мин. Чашки Петри (MatTek Corporation, P35G-0.170-14-C, США) диаметром 35 мм фиксировали на сменном поворотном барабане таким образом, чтобы ускоренные частицы пересекали предметное стекло и монослой клеток без потерь энергии. Образцы облучали перпендикулярно к плоскости прохождения пучка.

Измерение поглощенной дозы в образце на установке «Рокус-М» осуществляли с помощью тонкой проходной ионизационной камеры. В пределах площади образца неоднородность поля облучения не превышала 5 %.

Метод ДНК-комет. Суспензию клеток смешивали при 37 °С с 1%-м раствором LMA (low melting temperature agarose, Sigma-Aldrich, Германия), имеющей низкую температуру затвердевания, в соотношении 1 : 5. На заранее подготовленные слайды наносили 60 мкл приготовленной смеси и, накрыв покровным стеклом (24 × 24 мм), помещали в холодильник на 5 мин, затем покровное стекло осторожно удаляли. Полученные слайды переносили в емкость с лизирующим раствором (2,5 моль NaCl; 0,1 моль ЭДТА-Na₂ pH 10; 0,02 моль Трис-HCl pH 10; 1 % X-100; 10 % ДМСО), установленную в холодильнике. Лизис проводили в течение 12–14 ч.

Электрофорез в нейтральных условиях проводили при напряжении 0,5 В/см в течение 40 мин в низкосолевым ТАЕ-буфере pH 8,3 («ПанЭко», Россия).

Далее проводили нейтрализацию раствором 0,4 моль Трис-HCl pH 7,4 («ПанЭко», Россия), раскапывая его по 1,0 мл на каждый слайд. Данную процедуру повторяли трижды. После того как слайды хорошо просыхали на воздухе (до появления сеточки кристаллов на их поверхности), 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). Для регистрации изображений комет использовали флуоресцентный микроскоп Axiolab A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективом EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27 (Carl Zeiss, Германия) и цифровой CCD камерой AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия). С каждого слайда регистрировали ~ 100–200 комет.

Обработку изображения «кометы» проводили с помощью программы CASP [18]. Каждую комету характеризовали общепринятым параметром — моментом хвоста кометы mt , являющимся произведением доли ДНК в хвосте (Fm) и его медианы (Xm) [19]. Па-

раметр вычисляли по формулам

$$mt = Xm \cdot Ft, \\ Xm = \left[\sum_t (I_i \cdot X_i) \right] / \sum_t I_i, \quad Ft = \left(\sum_t I_i \right) / \left(\sum_c I_i \right). \quad (1)$$

Здесь I_i — интенсивность флуоресценции в точке i ; X_i — 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.

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ. Через определенные интервалы времени после облучения (5 мин – 24 ч) клетки дважды промывали в ФБ (Gibco, США) и фиксировали 4%-м свежеприготовленным раствором параформальдегида в ФБ. Далее проводили отмывание фиксированных препаратов при комнатной температуре. Для визуализации маркеров ДР ДНК (γ H2AX и 53BP1) использовались специфичные к этим маркерам первичные и вторичные антитела. Первичные антитела: моноклональные мышинные антитела к белку γ H2AX (ab22551, Abcam, США, 1 : 700) и поликлональные кроличьи антитела к белку 53BP1 (ab21083, Abcam, США, 1 : 600); вторичные: поликлональные козы антитела к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированные с флуоресцеин изоцианатом FITC (ab97239, Abcam, США, 1 : 200), и поликлональные козы антитела к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с Texas Red (ab6719, Abcam, США, 1 : 400). Ядра клеток визуализировали с использованием 600 нмоль раствора 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида DAPI (Sigma-Aldrich, Германия) в буфере для микроскопирования Vectashield (Vector Laboratories, США).

Изображения флуоресцентных сигналов в ядрах фибробластов получали на микроскопе AxioImager.M2, оснащенный световой системой оптического секционирования ApoTome.2 и монохромной цифровой камерой AxioCam MRm r.3.1. Использовали объектив EC Plan-Neofluar 100Ч/1.3 Oil Ph3/0.17 (Carl Zeiss, Германия), обеспечивающий увеличение в 1000 раз. Анализ полученных трехмерных изображений проводился в программе Acqiaqium [20], которая дает возможность различить индивидуальные фокусы γ H2AX и 53BP1 в изображении среза ядра в плоскостях XY , XZ и YZ . Количественная оценка колокализированных фокусов γ H2AX/53BP1 осуществлялась тремя операторами вручную в ~ 100 клетках каждого образца.

Статистический анализ и обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США). Статистическую значимость межгрупповых различий для выборок устанавливали по критерию Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Для описательной статистики использовали средние значения показателей и стандартную ошибку. Расчет параметра k , отражающего угол наклона прямой «доза–эффект», а также построение графиков проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены зависимости момента хвоста кометы (mt) от дозы γ -квантов и ускоренных ионов бора и азота с разными значениями ЛПЭ. Для всех использованных излучений наблюдается линейный характер выхода ДР ДНК в зависимости от дозы

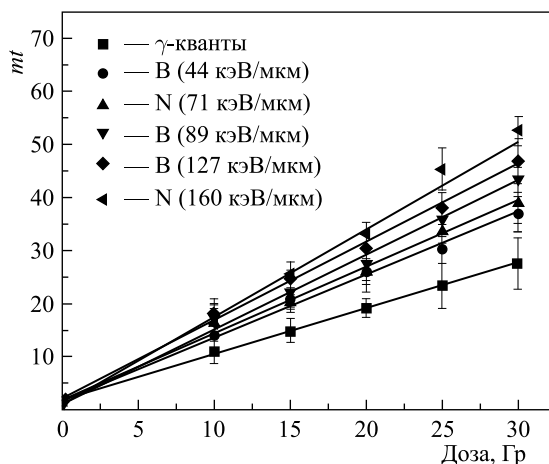


Рис. 1. Зависимость параметра mt от дозы облучения γ -квантами и ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N с разными значениями ЛПЭ

излучения. Как можно видеть, с увеличением ЛПЭ излучения наблюдается возрастание эффективности индукции ДР ДНК. На основании полученных данных были вычислены коэффициенты относительной биологической эффективности (ОБЭ) ускоренных ионов, определяемые как $\text{ОБЭ} = D_{\gamma}/D_{\text{ионы}}$, где $D_{\gamma}/D_{\text{ионы}}$ есть отношение доз, индуцирующих равные эффекты при γ -облучении и при действии ускоренных тяжелых ионов. Для ионов ^{11}B с ЛПЭ = 44, 89 и 127 кэВ/мкм величины ОБЭ соответственно составляют 1,4, 1,5 и 1,7. Для ионов ^{15}N с ЛПЭ = 70 и 160 кэВ/мкм эти значения равны 1,4 и 1,8 соответственно.

На рис. 2 приведены зависимости параметра mt от дозы γ -квантов и ускоренных ионов бора с разными значениями ЛПЭ, определяемые непосредственно после облучения в нормальных условиях инкубации и в присутствии АраЦ и ГМ. Как можно видеть, линейный характер кривых «доза–эффект» сохраняется для всех условий облучения. При этом следует заметить, что с увеличением ЛПЭ частиц наблюдается снижение модифицирующего влияния ингибиторов репарации на выход ДР ДНК, что отражается в значениях параметра k , характеризующего величину наклона зависимости «доза–эффект». Уменьшение модифицирующего эффекта АраЦ и ГМ отчетливо видно из табл. 2, где представлены значения фактора изменения дозы (ФИД), определяемые как $\text{ФИД} = k_{\text{мод}}/k_{\text{норм}}$, где $k_{\text{мод}}$ и $k_{\text{норм}}$ — параметры наклона зависимостей «доза–эффект» при действии радиомодификаторов и в нормальных условиях инкубации соответственно. Значения ФИД, определяемые непосредственно после облучения, варьируются от $1,71 \pm 0,04$ для γ -квантов до $1,06 \pm 0,03$ для ионов ^{15}N с ЛПЭ = 160 кэВ/мкм.

Как можно видеть на рис. 3, в ходе репарации повреждений ДНК в нормальных условиях при действии всех использованных излучений количество ДР ДНК снижается по экспоненциальной кинетике и практически завершается через 6 ч пострadiационной инкубации. В различные сроки после облучения в разных условиях были определены зависимости параметра mt от дозы γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов. В нормальных условиях значения параметра k , как это видно из табл. 3–8, снижаются при действии γ -квантов примерно в 4 раза (с $0,86 \pm 0,05$ до $0,19 \pm 0,02$), а для ускоренных ионов бора

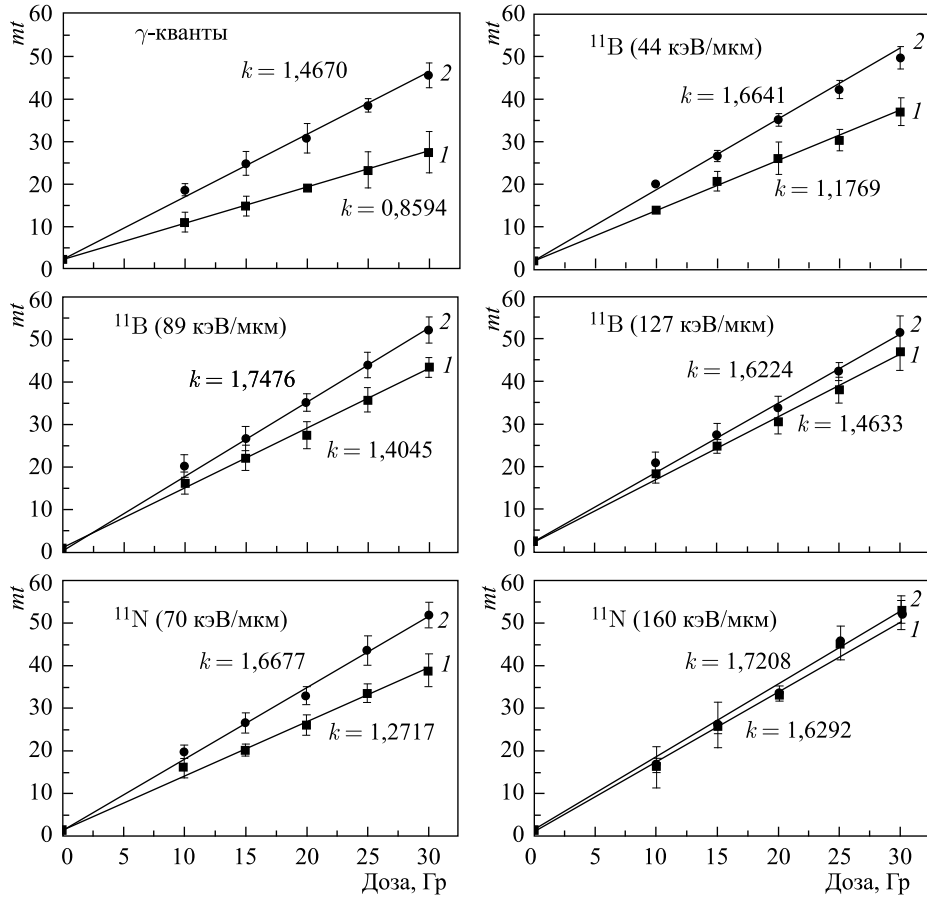


Рис. 2. Дозовые зависимости параметра mt , определяемые непосредственно после облучения γ -квантами и ускоренными ионами бора и азота с разными значениями ЛПЭ в обычных условиях (1) и в присутствии АраЦ и ГМ (2)

Таблица 2. Значения ФИД после облучения γ -квантами и ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N с разными значениями ЛПЭ

Время после облучения, ч	γ -кванты	^{11}B	^{15}N	^{11}B	^{11}B	^{15}N
		(44 кэВ/мкм)	(70 кэВ/мкм)	(89 кэВ/мкм)	(127 кэВ/мкм)	(160 кэВ/мкм)
0	$1,71 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,05$	$1,31 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$	$1,11 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,03$
2	$4,66 \pm 0,57$	$3,48 \pm 0,14$	$3,28 \pm 0,11$	$2,71 \pm 0,71$	$1,15 \pm 0,14$	$1,04 \pm 0,06$
4	$8,62 \pm 3,01$	$5,88 \pm 2,44$	$4,39 \pm 0,43$	$3,58 \pm 0,21$	$1,15 \pm 0,06$	$1,06 \pm 0,06$
6	$12,36 \pm 3,47$	$9,63 \pm 2,81$	$5,54 \pm 0,34$	$4,16 \pm 0,27$	$1,26 \pm 0,15$	$1,10 \pm 0,09$

Таблица 3. Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения γ -квантами

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой k		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$0,86 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,04$	$1,71 \pm 0,10$
2	$0,53 \pm 0,02$	$1,76 \pm 0,04$	$4,66 \pm 0,57$
4	$0,34 \pm 0,03$	$2,1 \pm 0,03$	$8,62 \pm 3,01$
6	$0,19 \pm 0,02$	$2,38 \pm 0,1$	$12,36 \pm 3,47$

Таблица 4. Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами $^{11}\text{В}$ (44 кэВ/мкм)

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой k		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,24 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,04$	$1,34 \pm 0,04$
2	$0,47 \pm 0,02$	$1,63 \pm 0,02$	$3,48 \pm 0,14$
4	$0,29 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,06$	$5,88 \pm 2,44$
6	$0,19 \pm 0,05$	$1,82 \pm 0,09$	$9,63 \pm 2,81$

Таблица 5. Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами $^{11}\text{В}$ (89 кэВ/мкм)

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой k		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,41 \pm 0,03$	$1,81 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$
2	$0,61 \pm 0,16$	$1,65 \pm 0,04$	$2,71 \pm 0,71$
4	$0,44 \pm 0,02$	$1,58 \pm 0,03$	$3,58 \pm 0,21$
6	$0,37 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,05$	$4,16 \pm 0,27$

Таблица 6. Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами $^{11}\text{В}$ (127 кэВ/мкм)

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой k		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,46 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,04$
2	$0,64 \pm 0,05$	$0,74 \pm 0,06$	$1,15 \pm 0,14$
4	$0,53 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,01$	$1,15 \pm 0,06$
6	$0,44 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,15$

и азота в 3–6 раз. Полученные материалы свидетельствуют о том, что репарация ДР ДНК в облученных клетках эффективно происходит при действии всех использованных в экспериментах излучений. Следует, однако, заметить, что в случае ионов бора и азота с высокой ЛПЭ количество неотрепарированных ДР ДНК остается к 6 ч на достаточно высоком уровне (рис. 4), что согласуется с результатами, полученными ранее [21–23].

Таблица 7. Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{15}N (70 кэВ/мкм)

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой k		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,27 \pm 0,02$	$1,66 \pm 0,04$	$1,31 \pm 0,05$
2	$0,48 \pm 0,16$	$1,57 \pm 0,03$	$3,28 \pm 0,11$
4	$0,37 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,02$	$4,39 \pm 0,43$
6	$0,30 \pm 0,02$	$1,68 \pm 0,02$	$5,54 \pm 0,34$

Таблица 8. Значения параметра наклона прямой (k) и ФИД после облучения ионами ^{15}N (160 кэВ/мкм)

Время после облучения, ч	Параметр наклона прямой k		ФИД
	Нормальные условия	АраЦ + ГМ	
0	$1,63 \pm 0,03$	$1,72 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,03$
2	$0,61 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,06$
4	$0,54 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$	$1,06 \pm 0,06$
6	$0,49 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,09$

В отличие от нормальных условий облучения в присутствии ингибиторов наблюдается резкое увеличение выхода ДР ДНК при действии γ -квантов в течение всего периода пострadiационной инкубации клеток. Значения параметра k , определяемые непосредственно после облучения, возрастают с $1,47 \pm 0,04$ до $2,38 \pm 0,11$ спустя 6 ч инкубации клеток. При облучении же ускоренными ионами ^{11}B и ^{15}N в условиях влияния АраЦ и ГМ величина выхода ДР ДНК в существенной мере зависит от ЛПЭ частиц. Так, для ионов бора с ЛПЭ = 44 кэВ/мкм, так же как и для γ -квантов, в пострadiационный период наблюдается увеличение количества ДР ДНК. Значения параметра k в этом случае возрастают с $1,66 \pm 0,04$ до $1,82 \pm 0,09$ (см. табл. 4). Для ускоренных ионов азота с ЛПЭ, равными 70 кэВ/мкм (см. табл. 7), значения параметра k сохраняются примерно на одинаковом уровне и составляют $\sim 1,60$. При более высоких ЛПЭ частиц (ионы ^{11}B , 89 кэВ/мкм) в пострadiационный период наблюдается незначительное уменьшение количества ДР ДНК (см. табл. 5). При определении непосредственно после облучения параметр k снижается с $1,81 \pm 0,06$ до $1,52 \pm 0,05$ через 6 ч инкубации. Для ионов ^{11}B и ^{15}N с ЛПЭ, соответственно равными 127 и 160 кэВ/мкм, изменения параметра k примерно одинаковы и близки к значениям, полученным в нормальных условиях (см. табл. 6, 8). Отличия заключаются лишь в том, что остаточное количество ДР ДНК в условиях влияния ингибиторов немного выше уровня ДР ДНК, наблюдаемых в нормальных условиях.

При анализе показателей ФИД, рассчитанных для излучений с разными физическими характеристиками и отражающими величину модифицирующего влияния использованных модификаторов на выход ДР ДНК, отчетливо видны их высокие значения в пострadiационный период при γ -облучении (~ 12 через 6 ч). В то же время значения ФИД уменьшаются с ростом ЛПЭ излучений, и для ионов ^{11}B и ^{15}N с высокими величинами ЛПЭ (127 и 160 кэВ/мкм) модифицирующее влияние АраЦ и ГМ на выход ДР ДНК практически отсутствует. Как уже ранее отмечалось, при γ -облучении клеток в присутствии АраЦ и ГМ происходит накопление разрывов в нитях ДНК. При этом не только наблю-

дается отсутствие репарации ДР ДНК, но и отмечается некоторое увеличение количества ДР со временем инкубации клеток. Такое обстоятельство может быть объяснено, с одной стороны, возможным ингибированием процессов репарации ДР ДНК, осуществляемое, как известно, двумя механизмами: гомологичной рекомбинацией и негомологичным соединением разорванных концов. С другой стороны, это может быть связано с формированием энзиматических ДР ДНК из длительно нерепарированных одонитевых разрывов ДНК вследствие блокирования репаративного синтеза ДНК этими агентами. Блокирование репарации концевых групп одонитевых разрывов арабинозидцитозинном может также происходить из пула ОР, образующихся в процессе инцизии модифицированных нуклеотидов в ходе эксцизионной репарации. Удаление таких повреждений в процессе эксцизионной репарации у клеток млекопитающих происходит в течение 3–4 ч после облучения [24]. В этом случае прямые и энзиматические ОР могут быть сайтами для формирования энзиматических ДР в результате атаки S_1 -эндонуклеазами нитей ДНК, оппозитных длительно нерепарируемым ОР [10–12].

Уменьшение модифицирующего влияния АраЦ и ГМ на выход ДР ДНК с ростом ЛПЭ излучений свидетельствует об изменении характера индуцируемых ДР ДНК при действии редко- и плотноионизирующих излучений. Микродозиметрический анализ частоты образования прямых двунитевых и одонитевых разрывов ДНК в зависимости от ЛПЭ излучений свидетельствует о том, что выход прямых ДР увеличивается, а ОР и поврежденных оснований уменьшается с возрастанием ЛПЭ [25]. Величина ЛПЭ ускоренных тяжелых ионов, как известно, зависит от заряда частиц (Z) и их кинетической энергии (E). Однако пространственное распределение энергии, передаваемой генетическим структурам тяжелыми ионами с одинаковой величиной Z и разными значениями E , различно (рис. 3). Приведенные данные наглядно демонстрируют более широкий трек ионов с энергией 33 МэВ/нуклон и с низкой плотностью δ -электронов (рис. 3, а) по срав-

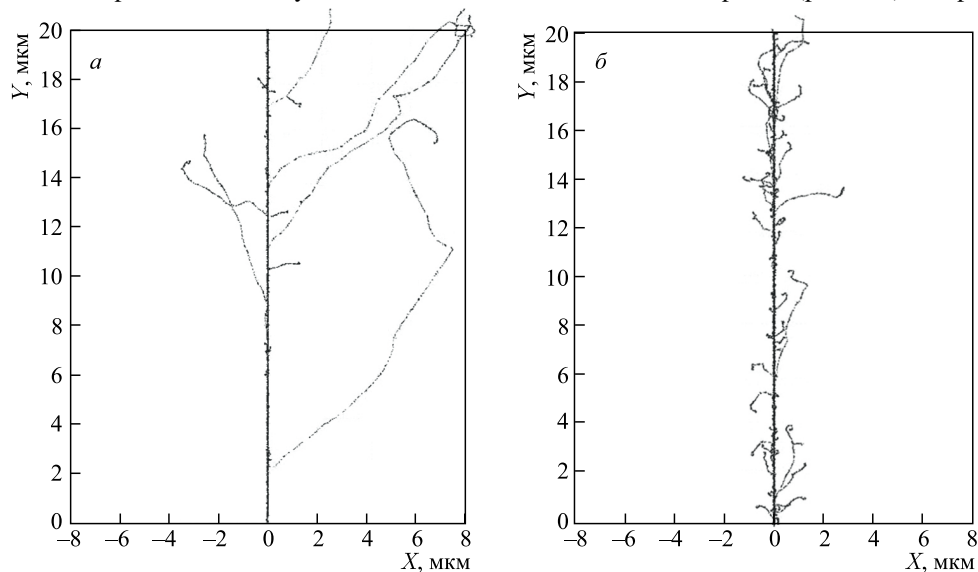


Рис. 3. Характер структуры треков ускоренных ионов бора ^{11}B с разной энергией частиц: а) 33 МэВ/нуклон, ЛПЭ = 44 кэВ/мкм; б) 9 МэВ/нуклон, ЛПЭ = 127 кэВ/мкм. Расчет с использованием программы RITRACKS v.3.1

нению с треком частиц малой энергии (9 МэВ/нуклон), характеризующимся высокой плотностью ионизаций и меньшими радиальными размерами (рис. 3, б).

Действительно, различия в пространственном распределении энергии тяжелых заряженных частиц с разными физическими характеристиками отражаются на выходе повреждений ДНК: возрастает количество прямых ДР ДНК с ростом ЛПЭ частиц и уменьшается выход ОР ДНК. Меньшие значения параметров ФИД при облучении клеток тяжелыми ионами, по-видимому, можно объяснить уменьшением количества индуцируемых ОР ДНК и поврежденных оснований с ростом ЛПЭ излучений — как субстрата, необходимого для формирования энзиматических ДР ДНК.

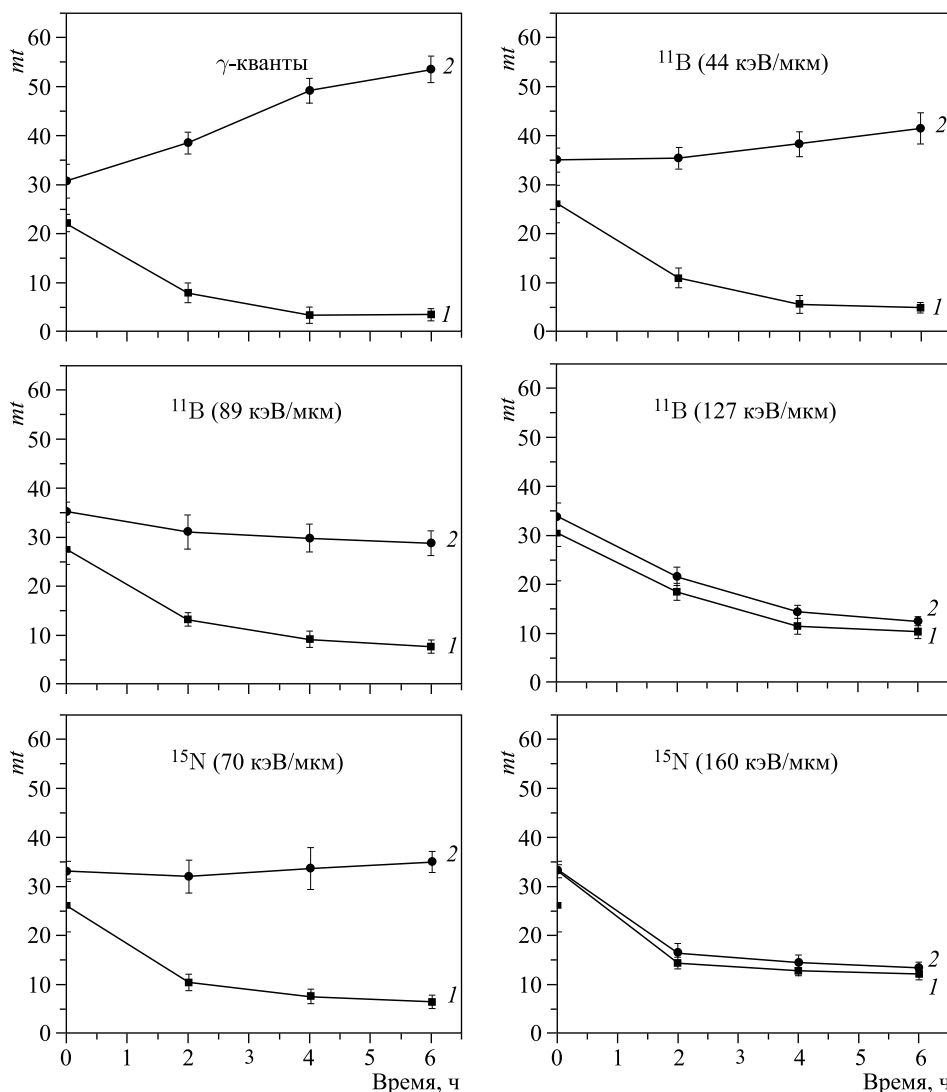


Рис. 4. Кинетика репарации ДР ДНК при действии γ -квантов и ионов ^{11}B и ^{15}N с разными значениями ЛПЭ в дозе 20 Гр в обычных условиях (1) и в присутствии АраЦ и ГМ (2)

На рис. 4 представлена кинетика репарации ДР ДНК при действии γ -квантов и ионов ^{11}B и ^{15}N с разными значениями ЛПЭ при дозе облучения, равной 20 Гр, в обычных условиях (1) и в присутствии АраЦ и ГМ (2). Как можно видеть, при γ -облучении в обычных условиях происходит репарация ДР ДНК по экспоненциальной кинетике. Аналогичная кинетика репарации повреждений наблюдается и при действии на клетки в обычных условиях ускоренных тяжелых ионов с различной ЛПЭ. Следует заметить, что остаточное количество неотрепарированных повреждений в период 4–6 ч после облучения увеличивается с ростом ЛПЭ частиц (рис. 5).

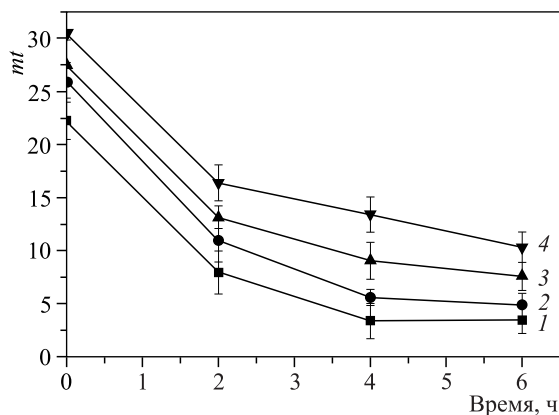


Рис. 5. Кинетика репарации ДР ДНК при действии γ -квантов (1) и ионов ^{11}B с разными значениями ЛПЭ: 44 кэВ/мкм (2), 89 кэВ/мкм (3), 127 кэВ/мкм (4) в дозе 20 Гр в нормальных условиях

Наряду с этим облучение клеток в присутствии использованных модификаторов разными типами излучений выявляет неоднозначную картину кинетики репарации повреждений ДНК. Так, при γ -облучении наблюдается не снижение количества индуцируемых ДР ДНК, а, наоборот, их значительное возрастание. Небольшое увеличение параметра mt со временем инкубации клеток отмечается и при действии ускоренных ионов бора с ЛПЭ = 44 кэВ/мкм. Практически неизменным со временем остается количество ДР ДНК при облучении ионами бора с ЛПЭ = 89 кэВ/мкм и ионами азота с ЛПЭ = 70 кэВ/мкм. Однако при действии частиц с высокими значениями ЛПЭ (ионов бора с ЛПЭ = 127 кэВ/мкм и азота с ЛПЭ = 160 кэВ/мкм) кинетика репарации в условиях влияния радиомодификаторов близка к той, что и при облучении в обычных условиях. Различия в кинетике репарации при γ -облучении, при действии заряженных частиц с промежуточными значениями ЛПЭ и частиц с высокими ЛПЭ объясняется различным вкладом прямых ОР ДНК и ОР энзиматического происхождения в формирование энзиматических ДР ДНК [26]. В пострadiационный период при облучении в условиях влияния АраЦ и ГМ в клетках происходят два разнонаправленных процесса: формирование дополнительно возникающих энзиматических ДР ДНК из длительно нерепарируемых ОР различного происхождения и репарация ДР ДНК (прямых и энзиматических ДР). Вследствие того, что выход ОР ДНК при γ -облучении велик и идет формирование дополнительных ОР в процессе эксцизионной репарации, восстановительные процессы, связанные с ДР ДНК, длительно растянуты во времени. В меньшей степени это проявляется при облучении частицами с промежуточными значениями ЛПЭ.

Малые значения ФИД при действии на клетки заряженных частиц с высокими значениями ЛПЭ (127–160 кэВ/мкм) можно объяснить, как уже указывалось, уменьшением количества индуцируемых ОР ДНК и поврежденных оснований с ростом ЛПЭ излучений — как субстрата, необходимого для формирования энзиматических ДР ДНК. Важно отметить, что при облучении клеток заряженными частицами с такими характеристиками в присутствии модификаторов не происходит блокирования репарационных процессов и кинетика репарации ДР ДНК в обычных условиях и в условиях влияния АраЦ и ГМ успешно осуществляется с минимальными различиями по экспоненциальной кинетике.

Для количественной оценки частоты образования ДР ДНК в отдельных ядрах клеток и их визуализации при действии разных типов излучений в обычных условиях и в присутствии модифицирующих агентов нами был использован иммуноцитохимический метод визуализации фокусов γ H2AX/53BP1 [27, 28]. Изображение индивидуальных фокусов γ H2AX/53BP1 в ядрах фибробластов человека через 4 ч после действия γ -квантов и ускоренных ионов азота с энергией 33 МэВ/нуклон (ЛПЭ 85 кэВ/мкм) в дозе 1,25 Гр при облучении в обычных условиях и в присутствии радиомодификаторов представлены

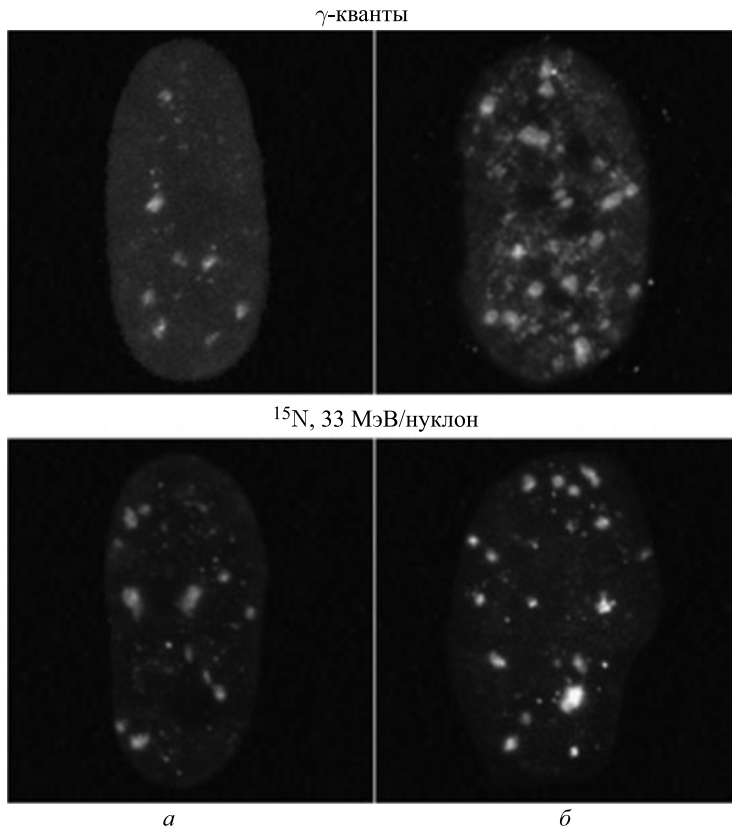


Рис. 6. Изображение индивидуальных фокусов γ H2AX/53BP1 в ядрах клеток человека через 4 ч после действия γ -квантов и ускоренных ионов азота с энергией 33 МэВ/нуклон (ЛПЭ 85 кэВ/мкм). Облучение γ -квантами дозой 1 Гр и ускоренными ионами азота дозой 1,25 Гр в обычных условиях (а) и в присутствии АраЦ и ГМ (б)

на рис. 6. Хорошо видно, что количество радиационно-индуцированных фокусов (РИФ) в пострадиационный период после γ -облучения в условиях влияния АраЦ и ГМ резко возрастает. Увеличение количества РИФ, отражающих образование в этих условиях двуниевых разрывов ДНК в генетических структурах клеток, однозначно свидетельствует о формировании ДР энзиматической природы. На это же указывают данные, полученные при облучении клеток ускоренными ионами азота. Однако количество РИФ в этом случае меньше по сравнению с γ -облученными клетками. Результаты количественного анализа формирования РИФ в ядрах клеток при действии γ -квантов и тяжелых заряженных частиц в обычных условиях и в присутствии АраЦ и ГМ представлены на рис. 7. Как можно видеть, при облучении клеток в нормальных условиях количество РИФ возрастает через 1 ч после лучевого воздействия, а затем уменьшается по экспоненциальной кинетике.

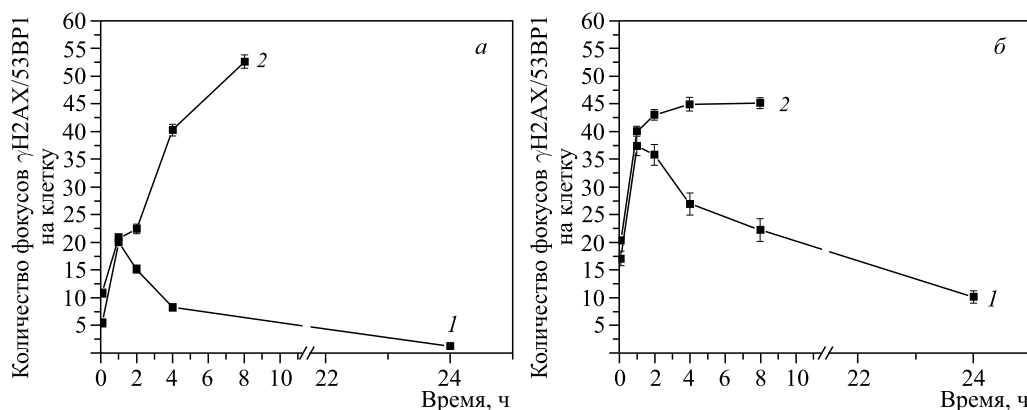


Рис. 7. Кинетика формирования и элиминации фокусов γ H2AX/53BP1 в ядрах клеток человека при действии γ -квантов (а) и ускоренных ионов азота (б) с энергией 33 МэВ/нуклон (ЛПЭ 85 кэВ/мкм). Облучение γ -квантами дозой 1 Гр и ускоренными ионами азота дозой 1,25 Гр в обычных условиях (1) и в присутствии АраЦ и ГМ (2)

К 24 ч пострадиационной инкубации клеток процессы репарации ДР ДНК полностью завершаются. В условиях влияния радиомодификаторов происходит резкое увеличение количества РИФ, которое сохраняется спустя 8 ч наблюдения. Эти результаты четко свидетельствуют о формировании ДР ДНК энзиматической природы в условиях влияния использованных ингибиторов синтеза ДНК. Похожая картина наблюдается и при облучении клеток ускоренными ионами азота с энергией 33 МэВ/нуклон. Однако сенсибилизирующий эффект ингибиторов по сравнению с γ -облучением значительно меньший. Данные о модифицирующем влиянии АраЦ и ГМ на формирование генетических нарушений, полученные нами методом ДНК-комет (см. табл. 5, рис. 4) и иммуноцитохимическим методом, указывают на близкий характер закономерностей образования ДР ДНК в этих условиях при действии частиц с ЛПЭ ~ 70 – 90 кэВ/мкм. Меньший эффект влияния ингибиторов и характер кинетики параметров mt и РИФ от времени инкубации клеток в пострадиационный период обуславливается, как указывалось выше, уменьшением количества индуцируемых ОР ДНК и поврежденных оснований с ростом ЛПЭ излучений — как субстрата, необходимого для формирования энзиматических ДР ДНК.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии ионизирующих излучений электромагнитной природы с малой величиной ЛПЭ и ускоренных заряженных частиц с высокими ЛПЭ в генетических структурах клеток могут формироваться двунитевые разрывы ДНК различного генеза. Такие нарушения образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков — прямые ДР, либо могут формироваться из других повреждений — однострунчатых разрывов прямого типа и ОР, образующихся в ходе эксцизионной репарации. Использование ингибиторов репаративного синтеза ДНК 1- β -D-арабинофуранозилцитозина и гидроксимочевины при облучении клеток ионизирующими излучениями с разными физическими характеристиками позволяет оценить относительный вклад ЭДР ДНК в суммарный выход ДР при действии ионизирующих излучений разного качества. При действии излучений с малой ЛПЭ этот вклад может быть весьма высок, однако для тяжелых заряженных частиц с высокой ЛПЭ он становится пренебрежимо малым.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sachs R. K., Chen A. M., Brenner D. J.* Review: Proximity Effects in the Production of Chromosome Aberrations by Ionizing Radiation // *Intern. J. Rad. Biol.* 1997. V. 71, No. 1. P. 1–19.
2. *Jackson S. P., Bartek J.* The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease // *Nature*. 2009. V. 461, No. 7267. P. 1071–1078.
3. *Kowalczykowski S. C.* Initiation of Genetic Recombination and Recombination-Dependent Replication // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25, No. 4. P. 156–165.
4. *Yokoya A., Cunniffe S. M. T., Watanabe R., Kobayashi K., O'Neill P.* Induction of DNA Strand Breaks, Base Lesions and Clustered Damage Sites in Hydrated Plasmid DNA Films by Ultrasoft X-Rays around the Phosphorus K-Edge // *Rad. Res.* 2009. V. 172, No. 3. P. 296–305.
5. *Борейко А. В., Чаусов В. Н., Красавин Е. А., Равначка И., Стукова С. И.* Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ // *Письма в ЭЧАЯ*. 2011. Т. 4, № 167. С. 670–678.
6. *Fram R. J., Kufe D. W.* Inhibition of DNA Excision Repair and the Repair of X-Ray-Induced DNA Damage by Cytosine Arabinoside and Hydroxyurea // *Pharmacol. Ther.* 1985. V. 31, No. 3. P. 165–176.
7. *Miller M. R., Chinault D. N.* Evidence That DNA Polymerases Alpha and Beta Participate Differentially in DNA Repair Synthesis Induced by Different Agents // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257, No. 1. P. 46–49.
8. *Prakasha Gowda A. S., Polizzi J. M., Eckert K. A., Spratt T. E.* Incorporation of Gemcitabine and Cytarabine into DNA by DNA Polymerase β and Ligase III/XRCC1 // *Biochemistry*. 2010. V. 49, No. 23. P. 4833–4840.
9. *Koç A., Wheeler L. J., Mathews C. K., Merrill G. F.* Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism That Preserves Basal dNTP Pools // *J. Biol. Chem. Am. Soc. Biochem. Mol. Biology*. 2004. V. 279, No. 1. P. 223–230.
10. *Weinfeld M., Rasouli-Nia A., Chaudhry M. A., Britten R. A.* Response of Base Excision Repair Enzymes to Complex DNA Lesions // *Rad. Res.* 2001. V. 156, No. 5, Part 2. P. 584–589.
11. *Harrison L., Malyarchuk S.* Can DNA Repair Cause Enhanced Cell Killing Following Treatment with Ionizing Radiation? // *Pathophysiol. Off. J. Intern. Soc. Pathophysiol.* 2002. V. 8, No. 3. P. 149–159.
12. *Rydberg B.* Radiation-Induced Heat-Labile Sites That Convert into DNA Double-Strand Breaks // *Rad. Res.* 2009. V. 153, No. 6. P. 805–812.

13. Nikjoo H., O'Neill P., Wilson W. E., Goodhead D. T. Computational Approach for Determining the Spectrum of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation // *Rad. Res.* 2001. V. 156, No. 5, Part 2. P. 577–583.
14. Urushibara A., Shikazono N., O'Neill P., Fujii K., Wada S., Yokoya A. LET Dependence of the Yield of Single-, Double-Strand Breaks and Base Lesions in Fully Hydrated Plasmid DNA Films by $4\text{He}(2+)$ Ion Irradiation // *Intern. J. Rad. Biol.* 2008. V. 84, No. 1. P. 23–33.
15. Чаусов В. Н., Борейко А. В., Красавин Е. А., Можалева А. В., Равначка И. И., Тиунчик С. И., Тронов В. А. Закономерности индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии ускоренных тяжелых ионов различных энергий // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2009. Т. 49, № 1. С. 73–77.
16. Заднепрянец М. Г., Борейко А. В., Буланова Т. С., Йежкова Л., Красавин Е. А., Куликова Е. А., Смирнова Е. В., Фальк М., Фалькова И. Закономерности формирования и элиминации $\gamma\text{H2AX/53BP1}$ -фокусов при действии γ -квантов и ускоренных тяжелых ионов // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2018. Т. 58, № 2. С. 146–156.
17. Безбах А. А., Загер В. Б., Камински Г., Крылов А. И., Крылов В. А., Тетерев Ю. Г., Тимошенко Г. Н. Модернизация установки «Геном» для проведения радиобиологических экспериментов на пучках тяжелых ионов // *Письма в ЭЧАЯ.* 2013. Т. 10, № 2(179). С. 274–280.
18. Kořca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gózdź S., Koza Z., Wojcik A. A Cross-Platform Public Domain PC Image-Analysis Program for the Comet Assay // *Mutat. Res.* 2003. V. 534, No. 1–2. P. 15–20.
19. Тронов В. А., Пелевина И. И. Метод ДНК-комет индивидуальных клеток. Принципы и применение метода // *Цитология.* 1996. Т. 38, № 4/5. С. 427–439.
20. Kozubek M., Matula P., Matula P., Kozubek S. Automated Acquisition and Processing of Multidimensional Image Data in Confocal *In Vivo* Microscopy // *Microsc. Res. Tech.* 2004. V. 64, No. 2. P. 164–175.
21. Coquerelle T. M., Weibezahn K. F., Lücke-Huhle C. Rejoining of Double-Strand Breaks in Normal Human and Ataxia-Telangiectasia Fibroblasts after Exposure to ^{60}Co Gamma-Rays, ^{241}Am Alpha-Particles or Bleomycin // *Intern. J. Rad. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 1987. V. 51, No. 2. P. 209–218.
22. Okayasu R. Repair of DNA Damage Induced by Accelerated Heavy Ions. A Mini Review // *Intern. J. Cancer.* 2012. V. 130, No. 5. P. 991–1000.
23. Wang M., Saha J., Hada M., Anderson J. A., Pluth J. M., O'Neill P., Cucinotta F. A. Novel Smad Proteins Localize to IR-Induced Double-Strand Breaks: Interplay between $\text{TGF}\beta$ and ATM Pathways // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41, No. 2. P. 933–942.
24. Calsou P., Salles B. Properties of Damage-Dependent DNA Incision by Nucleotide Excision Repair in Human Cell-Free Extracts // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22, No. 23. P. 4937–4942.
25. Michalik V. Model of DNA Damage Induced by Radiations of Various Qualities // *Intern. J. Rad. Biol.* 1992. V. 62, No. 1. P. 9–20.
26. Hirayama R., Ito A., Tomita M., Tsukada T., Yatagai F., Noguchi M., Matsumoto Y., Kase Y., Ando K., Okayasu R., Furusawa Y. Contributions of Direct and Indirect Actions in Cell Killing by High-LET Radiations // *Rad. Res.* 2009. V. 171, No. 2. P. 212–218.
27. Rothkamm K., Lobrich M. Evidence for a Lack of DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells Exposed to Very Low X-Ray Doses // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2003. V. 100, No. 9. P. 5057–5062.
28. Redon C. E., Dickey J. S., Bonner W. M., Sedelnikova O. A. $\gamma\text{-H2AX}$ as a Biomarker of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation in Human Peripheral Blood Lymphocytes and Artificial Skin // *Adv. Space Res.* 2009. V. 43, No. 8. P. 1171–1178.