

УДК 577.2.043:539.1

**С.А. Васильев¹, А.С. Уразова², А.А. Беленко², К.А. Кравченко²,
О.П. Кутенков³, Н.А. Скрябин¹, М.А. Большаков^{2,3},
И.Н. Лебедев¹, В.В. Ростов³**

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики СО РАМН (г. Томск)

² Томский государственный университет (г. Томск)

³ Институт сильноточной электроники СО РАН (г. Томск)

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ
№ 12-04-32046, РФФИ № 12-04-00893 и ФЦП № 8596.

В ранее проведенных нами исследованиях на лимфоцитах периферической крови человека был обнаружен феномен сниженной эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК в ответ на воздействие импульсно-периодическим рентгеновским излучением в малых дозах. Одним из объяснений наблюдаемого феномена может являться наличие в клетке порога активации систем антиокислительной защиты и систем репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК, достижение которого является необходимым условием для запуска и эффективного функционирования систем репарации. В связи с этим для анализа влияния уровня активных форм кислорода на эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК был проведен эксперимент по оценке уровня фокусов белка γ H2AX после воздействия импульсно-периодическим рентгеновским излучением на лимфоциты периферической крови человека, необработанные и предварительно обработанные 10 мкМ H_2O_2 . Было установлено, что добавление 10 мкМ H_2O_2 незначительно повышает уровень фокусов белка γ H2AX, но не влияет на радиочувствительность клеток. Также не было обнаружено значимых различий между долями репарированных двунитевых разрывов ДНК в предварительно обработанных и необработанных 10 мкМ H_2O_2 лимфоцитах. В связи с высокой вариабельностью результатов между донорами можно предположить, что эффекты воздействия зависят от индивидуальных особенностей.

Ключевые слова: импульсно-периодическое рентгеновское излучение; двунитевые разрывы ДНК; перекись водорода; активные формы кислорода; малые дозы ионизирующего излучения.

Введение

Человек постоянно подвергается воздействию ионизирующего излучения как от естественных, так и от искусственных источников. Влияние радиации

в высоких дозах является сравнительно изученным, в то время как в диапазоне малых доз отмечаются эффекты, механизм которых остается не ясным. Ранее была обнаружена нелинейная зависимость количества радиационно-индуцированных фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК γ H2AX и 53BP1 от дозы импульсно-периодического рентгеновского излучения (ИПРИ). Это выражалось в отклонении от линейности в сторону повышения эффекта в диапазоне 12–32 мГр и снижении эффекта относительно ожидаемого при дальнейшем увеличении дозовой нагрузки до 72 мГр и выше [1, 2]. При этом наблюдалась замедленная динамика исчезновения радиационно-индуцированных фокусов, образованных после воздействия ИПРИ в дозах, вызывающих отклонения от линейной дозовой зависимости. Подобные результаты были обнаружены и в других исследованиях, направленных на оценку уровня разрывов ДНК в клетках. В частности, отмечалась нелинейная зависимость количества фокусов γ H2AX и 53BP1 в фибробластах человека от дозы ионизирующего излучения в диапазоне 10–50 мГр [3]. Сходная гиперчувствительность к воздействию радиации в дозах менее 50 мГр была обнаружена в клетках V79-4 при использовании фокусов γ H2AX [4]. Кроме того, в лимфоцитах периферической крови после воздействия рентгеновскими лучами была обнаружена повышенная радиочувствительность в области малых доз [5]. Таким образом, в диапазоне доз 1–50 мГр наблюдались отклонения от линейной дозовой зависимости уровня двунитевых разрывов ДНК в различных типах клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Рабочей гипотезой, проверенной в настоящем исследовании, являлось предположение об обусловленности гиперчувствительности клеток к воздействию ионизирующего излучения в малых дозах наличием в клетке порога включения систем антиоксидательной защиты и репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК. Переменной, оцениваемой этим порогом, может быть либо уровень окислительного стресса, либо число окислительных повреждений ДНК. Интересно, что сами радиационно-индуцированные двунитевые разрывы ДНК, по крайней мере до определенного предела, по-видимому, не являются триггером для осуществления их эффективной репарации [6]. Таким образом, гиперчувствительность клеток в диапазоне сверхмалых доз радиации может быть связана с включением антиоксидантных систем и / или систем эффективной репарации повреждений только при уровнях окислительного стресса / окислительных повреждений ДНК, характерных для воздействия более высоких доз ионизирующего излучения. Это приводит к повышенному уровню радиационно-индуцированных повреждений ДНК при воздействии радиации в диапазоне 10–30 мГр в условиях недостаточной активности систем антиоксидантной защиты и эффективной репарации двунитевых разрывов ДНК. Поэтому целью настоящего исследования являлся анализ влияния экзогенного окислительного стресса на эффективность репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК.

Материалы и методики исследования

Материалом для исследования послужили лимфоциты периферической крови трех здоровых индивидов: 2 мужчин (28 и 24 лет) и 1 женщины (22 года). Забор крови из локтевой вены осуществляли в вакуумные пробирки типа Vacutainer (BD Bioscience, США), покрытые изнутри натриевой солью гепарина для предотвращения свертывания. Выделение лимфоцитов осуществляли посредством центрифугирования крови в градиенте Фиколлурографина ($\rho = 1,077$) («ПанЭко», Россия). Полученную суспензию разводили до концентрации 3×10^6 клеток/мл в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США). Затем суспензию делили на две части, в одну из которых добавляли 10 мкМ H_2O_2 и выдерживали 30 мин при температуре $+4^\circ C$. Далее каждую из частей разливали по 2 мл в пластиковые центрифужные пробирки (Greiner, США), пять из которых подверглись воздействию ионизирующего излучения в разных дозах, а одна оставалась в качестве контроля. Транспортировка образцов до места облучения производилась на льду.

В исследованиях использовался источник импульсно-периодического рентгеновского излучения «СИНУС-150» (Россия) (ускоряющее напряжение 260 кВ, сила тока 4 кА, энергия фотонов с максимумом 90–100 кэВ, длительность импульса 4 нс), разработанный в Институте сильноточной электроники СО РАН. Для достижения необходимой дозы облучения пробирки с культурой клеток размещались на определенном расстоянии от анода ускорителя. Измерения доз производились с использованием термомлюминесцентного дозиметра «КДТ-02М» (Россия) и электростатического дозиметра с кварцевым волокном серии «Argow-Tech», модель 138-S (США). Облучение лимфоцитов проводилось до 4 000 импульсов в дозах 0,003; 0,008; 0,018; 0,04 и 0,08 мГр/имп. при частоте повторения импульсов 13 имп./с.

Для оценки динамики формирования радиационно-индуцированных фокусов гистона $\gamma H2AX$, являющихся наиболее чувствительным маркером двунитевых разрывов ДНК, клетки инкубировали в термостате при $37^\circ C$ в течение 30 мин и 18 ч после облучения. После инкубации переносили по 1 мл суспензии в микроцентрифужные пробирки и центрифугировали 5 мин при 200 g $4^\circ C$, удаляли надосадочную жидкость и добавляли раствор фосфатного буфера (PBS). Проводили повторное центрифугирование в тех же условиях. Оставляли по 60 мкл клеточной суспензии, которую наносили на предметные стекла, покрытые полилизинем (Menzel, Германия). Препараты накрывали покровным стеклом и оставляли на 10 мин при комнатной температуре. Через 10 мин снимали покровные стекла и фиксировали препараты в 3%-ном растворе параформальдегида (Sigma, США) в течение 20 мин при $4^\circ C$.

При проведении процедуры иммуноокрашивания в качестве первичных антител были использованы моноклональные мышинные антитела к белку

γ H2AX (Novus, США). Вторичными антителами, несущими флуорохром, выступали кроличьи антитела, конъюгированные с родамином (Novus, США). На препараты раскапывали по 50 мкл 3%-ного раствора FBS с первичными антителами в концентрации 1:1 000 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в трех сменах PBS по 5 мин повторяли инкубацию со вторичными антителами в той же концентрации. Отмывали препараты в трех сменах PBS по 5 мин и окрашивали 0,3 мкМ раствором DAPI (Sigma, США). Для защиты препаратов от выцветания раскапывали на стекла заключающую среду Vectashield (Vector Labs, США), накрывали покровным стеклом и хранили в темноте до начала микроскопирования при 4°C.

Визуализация и анализ флуоресцентных сигналов осуществлялись на микроскопе Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с использованием системы для автоматического анализа цитогенетических препаратов Metafer (Metasystems, Германия). На каждом препарате производилась оценка количества фокусов белка γ H2AX в 300 клетках. Эксперимент был проведен в 3 повторях. Оценка уровня фокусов белка γ H2AX проводилась с использованием многофакторного анализа (ANOVA) с поправкой на множественность сравнений. Все статистические процедуры были проведены с помощью программного обеспечения StatSoft STATISTICA 8.0.

Результаты исследования и обсуждение

Уровень фокусов γ H2AX был статистически значимо выше по сравнению с контролем через 30 мин после воздействия ИПРИ в дозах 160 и 320 мГр. Меньшие дозы ИПРИ (12–32 мГр) также приводили к повышению уровня фокусов γ H2AX, однако значимых отличий с контролем не было обнаружено. При этом не было обнаружено значимых отличий между уровнем фокусов γ H2AX в необработанных и предварительно обработанных 10 мкМ H_2O_2 лимфоцитах. Чтобы выявить количество фокусов γ H2AX, образованных в результате воздействия непосредственно облучения, а не дополнительного окислительного стресса, от каждого результата был вычтен контроль. Таким образом, были получены дозовые зависимости радиационно-индуцированных фокусов белка γ H2AX, которые также не различались значимо как в необработанных, так и в предварительно обработанных 10 мкМ H_2O_2 лимфоцитах (рис. 1). Это указывает на то, что дополнительный экзогенный окислительный стресс не способствует повышению уровня радиационно-индуцированных фокусов, т.е. не влияет на радиочувствительность клеток.

После воздействия ИПРИ на временном отрезке между 30 мин и 18 ч после облучения без добавления 10 мкМ H_2O_2 количество фокусов значимо снижается при воздействии в дозах 160 и 320 мГр, а на фоне H_2O_2 – в диапазоне доз 72–320 мГр ($p < 0,01$) (рис. 1). Это свидетельствует о нормально протекающей репарации двунитевых разрывов ДНК. Кроме того, была оценена доля остаточных фокусов через 18 ч после облучения относительно

30 мин после воздействия ИПРИ, и у двух из трех принимавших участие в эксперименте доноров отмечено повышение количества фокусов белка γ H2AX через 18 ч после воздействия ИПРИ в дозе 12 мГр в предварительно необработанных H_2O_2 клетках (с 0,53 и 0,51 до 0,64 и 0,80 фокусов на клетку соответственно). Это может быть обусловлено индивидуальными различиями между донорами.

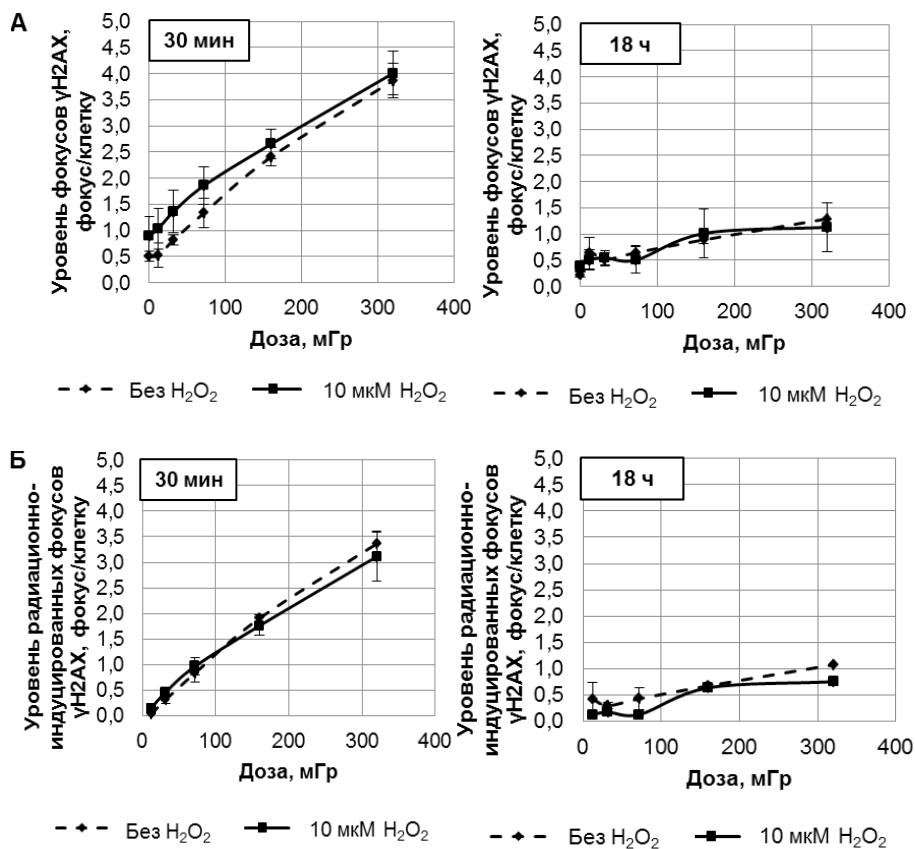


Рис. 1. Уровень фокусов белка γ H2AX без добавления H_2O_2 и при добавлении 10 мкМ H_2O_2 в лимфоцитах периферической крови человека ($n = 3$) через 30 мин и 18 ч после воздействия импульсно-периодическим рентгеновским излучением в малых дозах.

Данные представлены в виде средних арифметических \pm стандартная ошибка:

А – без вычета контрольных значений; Б – за вычетом контрольных значений

Недавно была высказана гипотеза, предполагающая, что запуск и протекание репарации двуниевых разрывов ДНК после воздействия радиации зависят от присутствия либо окислительного стресса, либо одностранных разрывов ДНК. Это было подтверждено в исследовании влияния малых доз ионизирующего излучения на динамику репарации двуниевых разрывов

ДНК в фибробластах человека [6]. Репарация двунитевых разрывов ДНК (оцененная как возникновение и исчезновение радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX) была затруднена при воздействии радиации в дозах менее 10 мГр. После воздействия ионизирующего излучения в дозе 2,5 мГр клетки вообще не смогли репарировать двунитевые разрывы ДНК вплоть до 72 ч после воздействия. Интересно, что при обработке клеток 10 мкМ H_2O_2 перед воздействием радиации в клетках наблюдалась полная репарация всех радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК. Авторы делают вывод о том, что окислительного стресса после воздействия малых доз радиации недостаточно для запуска сигнальных путей, приводящих к репарации двунитевых разрывов ДНК [6]. Обработка клеток H_2O_2 вызывает значительное повышение окислительного стресса и количества одонитевых разрывов ДНК, что, видимо, приводит в том числе и к запуску процессов репарации двунитевых разрывов ДНК.

Наши данные частично противоречат результатам, полученным в эксперименте на фибробластах человека [6]. Как и в ранее проведенных нами исследованиях, была установлена сниженная эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК после воздействия непрерывным γ -излучением в малых дозах. Также было показано, что предварительно обработанные 10 мкМ H_2O_2 клетки репарировали все двунитевые разрывы ДНК. Это объяснялось тем, что добавление 10 мкМ H_2O_2 ведет к повышению уровня активных форм кислорода, активируя определенный пороговый механизм запуска репарации двунитевых разрывов ДНК. Напротив, в настоящем исследовании не было обнаружено никакого модифицирующего влияния H_2O_2 на эффективность репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК. Данная несогласованность между полученными результатами может быть обусловлена использованием различных способов облучения (ИПРИ и непрерывное γ -излучение), типа клеток (лимфоциты и фибробласты человека), а также разными условиями проведения эксперимента. Кроме того, в настоящем исследовании была обнаружена высокая вариабельность эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК после воздействия ИПРИ в дозе 12 мГр. В связи с этим можно предположить, что эффекты воздействия зависят от индивидуальных особенностей доноров, поэтому в дальнейшем необходимо провести детальный анализ межиндивидуальных отличий эффективности репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК в клетках человека.

Заключение

Не было обнаружено значимого влияния дополнительного экзогенного окислительного стресса на эффективность репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов после воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения в малых дозах.

Литература

1. Васильев С.А., Степанова Е.Ю., Кутенков О.П. и др. Двунитевые разрывы ДНК в лимфоцитах человека после однократного воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения в малых дозах: нелинейная дозовая зависимость // Радиационная биология. Радиоэкология. 2012. Т. 52, № 1. С. 31–38.
2. Васильев С.А., Беленко А.А., Кутенков О.П. и др. Различия эффектов импульсно-периодического рентгеновского излучения в опухолевых клетках линии MOLT-4 и лимфоцитах периферической крови человека // Сибирский онкологический журнал. 2013. № 2. С. 45–49.
3. Markova E., Schultz N., Belyaev I.Y. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival // International Journal of Radiation Biology. 2007. Vol. 83, № 5. P. 319–329.
4. Leatherbarrow E.L., Harper J.V., Cucinotta F.A., O'Neill P. Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation // International Journal of Radiation Biology. 2006. Vol. 82, № 2. P. 111–118.
5. Beels L., Werbrouck J., Thierens H. Dose response and repair kinetics of gamma-H2AX foci induced by in vitro irradiation of whole blood and T-lymphocytes with X- and gamma-radiation // International Journal of Radiation Biology. 2010. Vol. 86, № 9. P. 760–768.
6. Grudzinski S., Raths A., Conrad S. et al. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2010. Vol. 107, № 32. P. 14205–14210.

Поступила в редакцию 04.10.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 4 (24). P. 109–116

Stanislav A. Vasilyev¹, Arina S. Urazova², Andrey A. Belenko²,
Kristina A. Kravchenko², Oleg P. Kutenkov³, Nikolay A. Skryabin¹,
Mikhail A. Bol'shakov^{2,3}, Igor N. Lebedev¹, Vladislav V. Rostov³

¹ Institute of Medical Genetics of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Medical Science, Tomsk, Russia

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Institute of High Current Electronics of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Science, Tomsk, Russia

EFFECTIVENESS OF DNA DOUBLE STRAND BREAK REPAIR IN HUMAN LYMPHOCYTES EXPOSED TO PULSED X-RAYS DEPENDING ON REACTIVE OXYGEN SPECIES LEVEL

This work was partially supported by RFBR grants
№ 12-04-32046, 12-04-00893 and FTP grant 8596.

Effects of high doses of ionizing radiation in human cells are well studied while mechanisms of some phenomena in the low dose range, including bystander effect, radiation-induced chromosome instability and hypersensitivity to low doses of ionizing radiation, remain not clear. Moreover, repair of DNA double strand breaks is deficient after exposure of human cells to very low doses of ionizing radiation. Earlier, such reduced DNA double strand break repair was observed in human peripheral blood

lymphocytes after exposure to very low dose pulsed X-rays. It was suggested that there was a radiation-induced oxidative threshold for activation of antioxidant system and repair of radiation-induced DNA double strand breaks which is essential for efficient functioning of DNA repair pathways. Thus, in this study we analyzed the effects of exogenously added reactive oxygen species on effectiveness of DNA double strand break repair. With this aim, the level of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) foci, which is the most sensitive marker of DNA double strand breaks, was assessed in human lymphocytes incubated with $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ in the medium with the following exposure to low dose pulsed X-rays. It was observed that $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ slightly increased the level of γ H2AX foci at 30 min after irradiation in both irradiated and control cells. On the contrary, $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ did not affect radiosensitivity of human lymphocytes measured as an excess level of γ H2AX foci. Moreover, there was no significant effect of $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ on the effectiveness of DNA double strand break repair at 18 h after irradiation. At the same time, the level of radiation-induced γ H2AX foci decreased significantly at 18 h for doses higher than 72 mGy in lymphocytes exposed to $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ while in lymphocytes non-exposed to $10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ such decrease was observed only for doses higher than 160 mGy. Our results are partially inconsistent with the previous study of effectiveness of DNA double strand break repair in human fibroblasts in which the significant effect of reactive oxygen species was observed. High variability of effectiveness of DNA double strand break repair was shown for different donors after irradiation to 12 mGy of pulsed X-rays suggesting that effects of H_2O_2 on DNA repair probably depend on individual features.

Key words: pulsed X-rays; DNA double strand break; hydrogen peroxide; reactive oxygen species; low dose ionizing radiation.

Received October 04, 2013