

УДК 577.346

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ A549 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНОЙ МОЩНОСТЬЮ ДОЗЫ

© 2022 г. В. А. Стельмухова^{1,2}, А. А. Цишнатти^{1,2,*}, С. М. Роднева², Н. М. Сметанина²,
Ю. А. Федотов², Д. В. Гурьев²

¹Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409, Россия

²ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 123098, Россия

*e-mail: AATsishnatti@mephi.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 23.08.2022 г.

В данном исследовании изучено влияние фактора мощности дозы ионизирующего излучения на индукцию и эффективность восстановления двунитевых разрывов (ДР) ДНК с дальнейшим прогностическим анализом выживания опухолевых клеток человека. Клетки линии A549 подвергали облучению на рентгеновской установке в дозе 2 Гр при мощностях доз 10 и 400 мГр/мин. По степени фрагментации ДНК, иммуноцитохимическому окрашиванию на белки γ H2AX и RAD51, клоногенному тесту было выявлено, что репарация ДР ДНК при воздействии редкоионизирующего излучения с мощностью дозы 10 мГр/мин протекает с меньшей скоростью, чем при воздействии с мощностью дозы 400 мГр/мин, при этом гомологичная рекомбинация преобладает как механизм репарации; в клетках, подвергшихся облучению с мощностью дозы 400 мГр/мин, превалируют иные системы репарации ДР ДНК; способность опухолевых клеток образовывать колонии после воздействия ионизирующего излучения (ИИ) с мощностями доз 10 и 400 мГр/мин существенно уменьшается в сравнении с необлученными клетками, однако при сравнении репродуктивной гибели облученных с разными мощностями доз клеток различий не выявлено.

Ключевые слова: A549, карцинома легкого человека, двунитевые разрывы ДНК, мощность дозы, γ H2AX, RAD51, степень фрагментации ДНК, клоногенный тест

DOI: 10.56304/S2304487X22030105

ВВЕДЕНИЕ

Воздействие ИИ на живые клетки индуцирует различные внутриклеточные события, включая ДР ДНК, особенности возникновения и репарации которых достаточно хорошо изучены при остром воздействии ИИ в различных дозах. Однако вопрос об изменении кинетики данных процессов при воздействии ИИ в одной дозе, но с различной ее мощностью, до сих пор остается открытым. Изучение этих механизмов позволит подбирать наиболее эффективные подходы к стратегии лучевой терапии при лечении онкобольных.

При изучении влияния мощности доз редкоионизирующего излучения на образование ДР ДНК в клетках китайского хомячка линии V79 было установлено, что при остром облучении количество ДР ДНК линейно зависит от дозы облучения [4]. Изменение характера кривой “доза–

эффект” на экспоненциальный наблюдается при снижении числа ДР как следствие снижения мощности дозы. Это объясняется тем, что при более низкой мощности дозы время воздействия ИИ на клетки увеличивается и кривая “доза–эффект” демонстрирует образование ДР ДНК и их репарацию как два одновременно протекающих процесса. С помощью метода ДНК-комет в пересчете на дозу излучения также было выявлено снижение степени фрагментации ДНК при снижении мощности дозы.

Результаты изучения культуры фибробластов кожи человека после облучения показали [2], что максимальное количество ДР ДНК после воздействия ИИ с высокой мощностью дозы наблюдается уже через полчаса после облучения, а через 24 ч после воздействия данный показатель экспоненциально снижается, практически достигая контрольных значений. При пролонгированном воздействии ИИ максимальное значение отсутству-

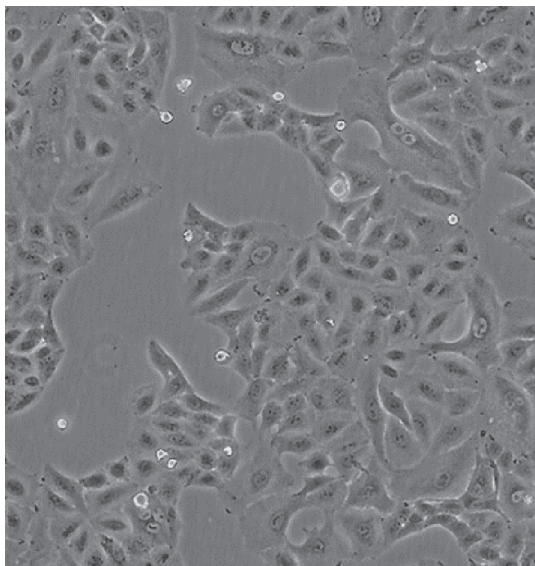


Рис. 1. Культура клеток линии A549. Объектив $\times 40$.

ет, но наблюдается плавное уменьшение числа ДР ДНК в течение 24 ч, имеющее экспоненциальный характер.

Репарация ДР ДНК при действии ионизирующего излучения в основном осуществляется двумя системами — нехомологичное соединение концов (НГСК) и гомологичная рекомбинация (ГР).

НГСК инициируется связыванием белка-гетеродимера Ku 70/80 (Ku) с концами ДНК, имеющей ДР. Процесс довольно стремительный и результативный по причине высокой способности этого протеина связываться с молекулой ДНК при условии его присутствия в ядре клетки в большом количестве. Связываясь с молекулой ДНК, белок Ku предотвращает расщепление ее концов протеазами. Ku, связанный с ДНК, взаимодействует с каталитической субъединицей протеинкиназы (ПК) и формирует комплекс ДНК-ПК, который активирует киназную активность ДНК-зависимых протеинкиназ (ДНК-ПКкс). Киназная активность этих ферментов преимущественно регулирует концевой процессинг и НГСК посредством аутофосфорилирования. Обработанные и пригодные для лигирования концы ковалентно соединяются с помощью ДНК-лигазы IV [1].

ГР использует в качестве шаблона для репарации разрыва гомологичную хроматиду. Начальным шагом ГР является вырезание участка ДНК в направлении 5'-3' с образованием одноцепочечных 3'-ОН хвостов ДНК. Затем фактор репликации α (RPA) связывается с 3'-концом одноцепочечной ДНК, предотвращая образование вторичных структур и поддерживая ее в неспаренном

состоянии. Впоследствии, RPA замещается белком RAD51.

RAD51 является ДНК-зависимой АТФазой, образующей с ДНК нуклеопротеидные филаменты и является маркером ГР. Связывание RAD51 с ДНК способствует внедрению в неповрежденную ДНК и вытеснению нити, которое вызывает образование D-петли, необходимое для генерации структуры Холлидея — молекулы гетеродуплекса. Репарация происходит с использованием неповрежденной нити в качестве матрицы с последующим лигированием концов ДНК. Часто образуется вторичная структура Холлидея. Разрушение структуры Холлидея завершает процесс, образуя кроссоверные или некрсоверные продукты в зависимости от направления вносимого разреза [3].

ГР происходит только в клетках, находящихся в S или G_2 фазах клеточного цикла, когда становится возможным использование гомологичных хроматид, вследствие репликации ДНК, а также наблюдается при коллапсе репликативной вилки, в то время как НГСК является основным механизмом репарации ДР ДНК в фазах G_0 и G_1 .

После облучения с разными мощностями доз культуры фибробластов кожи человека оценивали вовлеченность ГР как наиболее точного механизма репарации ДР ДНК [2]. В ходе данного исследования было получено, что увеличение числа фокусов RAD51 как маркеров ГР происходит при уменьшении мощности дозы. Был сделан вывод о более активном протекании процесса репарации ДР ДНК по механизму ГР при облучении с низкой мощностью дозы, чем при облучении с высокой.

Целью настоящего исследования было изучение влияния фактора мощности дозы ионизирующего излучения на индукцию и эффективность репарации ДР ДНК с дальнейшим прогностическим анализом выживания опухолевых клеток человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КУЛЬТУРА КЛЕТОК И УСЛОВИЯ ОБЛУЧЕНИЯ

В работе использовали линию опухолевых клеток человека A549 (карцинома легкого человека) (рис. 1).

Культивирование проводили в питательной среде DMEM/ F_{12} (Thermo Fisher Scientific, США), в которую добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific, США) и антибиотики пенициллин-стрептомицин в стандартных условиях CO_2 -инкубатора ($37^\circ C$, 5% CO_2). Смену среды проводили раз в три дня. При достижении 75–80% конфлюэнтности, клеточную культуру снимали с пластика фермен-

тативным путем и высаживали в зависимости от задачи эксперимента на покровные стекла или в культуральные флаконы.

Клетки облучали в дозе 2 Гр на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) на гранулярной подложке при температуре 37°C с мощностями доз 400 мГр/мин (200 кВ, 2 × 2.4 мА, фильтр 1.5 мм Al) и 10 мГр/мин (50 кВ, 2 × 0.4 мА, фильтр 1.5 мм Al).

Инкубацию облученных клеток осуществляли в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37°C, 5% CO₂) в течение 1–24 ч в зависимости от условий эксперимента.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ КЛЕТОК

Оценку особенностей репарации ДР ДНК проводили при помощи иммуноцитохимического окрашивания клеток с использованием антител, специфичных к белкам, которые участвуют в процессах репарации ДР. При определении наличия ДР ДНК и восстановлении ее структуры образуются динамические микроструктуры, которые содержат сотни-тысячи копий белков, задействованных в этих процессах (гамма-H2AX, АТМ, 53BP1 и др.). Применение метода иммуноцитохимического окрашивания с использованием специфичных к определенному белку антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями, делает возможным выявление этих структур, которые видны в микроскоп как ярко флуоресцирующие микрообласти (точки), получившие в литературе название фокусы репарации (repair foci). Распознавание таких фокусов способствует получению информации о расположении ДР ДНК в ядре клетки, их количестве и кинетике репарации. В данном исследовании проводили анализ фокусов белков γH2AX и RAD51.

Для проведения иммуноцитохимического анализа, клетки пассировали на стерильные покровные стекла в чашках Петри ($d = 35$ мм, Corning, США) в объеме клеточной суспензии, равном 3 мл, из расчета 5×10^4 кл/чашку.

Спустя 1, 2, 4 и 24 часа после воздействия ИИ, клетки фиксировали 20 мин при комнатной температуре на покровных стеклах с помощью параформальдегида (4% в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) с последующей двойной промывкой фосфатно-солевым буфером (pH 7.4). Затем осуществляли пермеабиллизацию 0.3% Тритоном-X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), который содержал 2% сывороточный альбумин быка для предотвращения неспецифического связывания первичных и вторичных антител.

Клетки, находящиеся на покровных стеклах, переносили на предметные стекла, инкубировали с первичными антителами (кроличьи монокло-

нальные антитела к белку γH2AX (Merck-Millipore, США) в разведении 1/200) в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем стекла промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч со вторичными антителами IgG (H + L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина.

Окраска ДНК и предотвращение фотовыцветания проводились с помощью заключающей среды ProLong Gold, содержащей DAPI (Life Technologies, США).

Визуализация иммуноцитохимических микроизображений осуществлялась на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенным видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340–380 нм возбуждение и 435–485 нм эмиссия), В-2E/C (465–495 нм возбуждение и 515–555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540–580 нм возбуждение и 600–660 нм эмиссия). На экспериментальную точку проводили анализ не менее 200 клеток.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК

Анализ степени фрагментации ДНК клеток проводили для оценки степени поврежденности их генома. С этой целью спустя 15 мин после воздействия ИИ клетки снимали с культуральных флаконов трипсинизацией, отмывали и вносили в агарозный гель с последующей подготовкой слайдов с иммобилизованными в агарозе клетками, после чего слайды переносили на 1 час в холодный (4°C) лизирующий буфер (2.5 моль/л NaCl, 100 ммоль/л Na₂EDTA, 20 ммоль/л Tris HCl, pH 10.0, 1% Triton X100 и 10% DMSO) и инкубировали в темноте при 4°C. Для щелочной денатурации нитей ДНК слайды с лизированными клетками на 20 мин помещали в холодный (4°C) щелочной раствор (300 ммоль/л NaOH, 2 ммоль/л EDTA Na₂, pH >13).

После этого проводили нейтрализацию (трехкратная промывка в трис-боратном буфере, pH 8.2) для обеспечения ренатурации ДНК и промывали слайды в дистиллированной воде и фиксировали 10 мин в 70%-ном этаноле.

Акридиновый оранжевый использовали в качестве флуоресцентного красителя для окраски

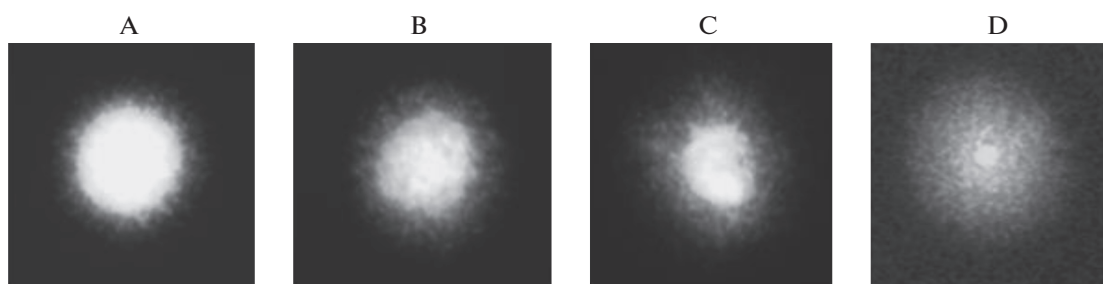


Рис. 2. Различные классы ДНК-гало клеток линии A549: А — отсутствие гало; В — гало присутствует, но при этом размеры и интенсивность флуоресценции ядерной области меняются незначительно; С — хорошо выраженное гало; D — максимальная выраженность гало, большая часть ДНК фрагментирована.

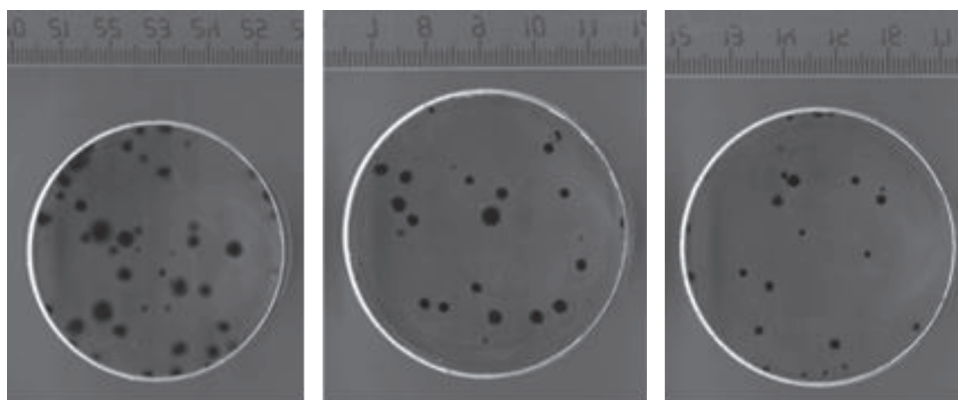


Рис. 3. Колонии, образованные клетками, облученными с разной мощностью дозы. Слева направо: контроль, 10 мГр/мин, 400 мГр/мин.

ДНК. В каждой экспериментальной группе анализировали по 150–200 нуклеоидов. Исходя из того, насколько ярко выражена степень диффузии фрагментов ДНК, нуклеоиды разделяли на следующие классы: А — гало отсутствует; В — гало присутствует, однако изменения размеров и интенсивности флуоресценции ядерной области незначительны; С — гало выражено хорошо; D — гало максимально, фрагментация большей части ДНК. На рис. 2 показаны микрофотографии четырех вышеуказанных классов нуклеоидов. Индекс ДНК-гало рассчитывали по формуле $ИДГ = (0 \times nA + 1 \times nB + 2 \times nC + 3 \times nD) / \Sigma$, где nA , nB , nC и nD — число нуклеоидов в классах А, В, С и D, а Σ — сумма всех подсчитанных нуклеоидов.

КЛОНОГЕННЫЙ ТЕСТ

Анализ репродуктивной гибели клеток без воздействия ИИ и после воздействия с различной мощностью дозы проводили с помощью клоногенного теста. С этой целью клетки трех полученных экспериментальных групп сразу после воздействия ферментативно снимали с культуральных флаконов, производили их подсчет и высаживали в чашки Петри ($d = 60$ мм. Corning,

США) в количестве 100 клеток на чашку для контрольной группы и 500 клеток на чашку для облученных групп клеток. По прошествии двух недель полученные колонии фиксировали и окрашивали 1% раствором кристаллвиолета. Для каждой экспериментальной группы высадку клеток и подсчет полученных от них колоний производили не менее, чем в 5 чашках Петри. Подсчет осуществляли только хорошо видимых колоний, содержащих не менее 50 клеток (рис. 3).

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Обработку полученных данных, построение графиков и статистическую обработку результатов проводили в программе MS Office “Excel” 2019 и OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Нортгемптон, Массачусетс, США). Для попарного сравнения групп использовали t -критерий Стьюдента.

Все результаты исследований показаны в виде среднего арифметического трех независимых экспериментов \pm ошибка средней. Было проведено от 3 до 5 повторов для каждого эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК В КЛЕТКАХ A549 ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНОЙ МОЩНОСТЬЮ ДОЗЫ

В данном эксперименте проводили сравнительный количественный анализ степени фрагментации ДНК после воздействия редкоионизирующим излучением в дозе 2 Гр с мощностями доз 10 и 400 мГр/мин. Следует отметить, что данный метод оценки поврежденности генома учитывает как одонитевые (ОР), так и ДР ДНК. Анализ проводили спустя 15 мин после облучения, поэтому наблюдаемые повреждения относились к первоначальным.

В результате проведенных исследований выявлено увеличение степени фрагментации ДНК с увеличением мощности дозы ионизирующего излучения (рис. 4).

Было выявлено достоверное увеличение степени поврежденности ДНК в группах облученных клеток в сравнении с контрольной группой, однако между группами клеток, облученными в дозе 2 Гр с мощностями 10 и 400 мГр/мин, достоверных различий выявлено не было.

Подобные закономерности встречаются и в результатах, полученных в эксперименте по изучению степени фрагментации ДНК в клетках китайского хомяка линии V79 методом ДНК-комет при различных мощностях дозы [4], в ходе которого было установлено, что степень фрагментации ДНК снижается при снижении мощности дозы.

Следует отметить, что длительность облучения была различной: 200 мин для мощности дозы 10 мГр/мин и 5 мин для мощности дозы 400 мГр/мин. Выявлена тенденция к снижению степени фрагментации ДНК (показатель жизнеспособности клеток) после облучения в течение 200 мин по сравнению с этими показателями в клетках, облученных в течение 5 мин, однако, как отмечено выше, достоверных различий не было. Видимо, это связано с тем, что облучение длительностью несколько часов (200 мин) ведет наряду с индукцией ДР ДНК к активации процессов репарации этих повреждений (температура 37°C поддерживалась постоянно). Кроме того, процессы репарации в асинхронизированных клетках могут привести к формированию большого количества разрывов, возникающих вследствие работы ферментов репарации, поэтому важно оценивать кинетику репарации ДР ДНК в течение нескольких часов после радиационного воздействия.

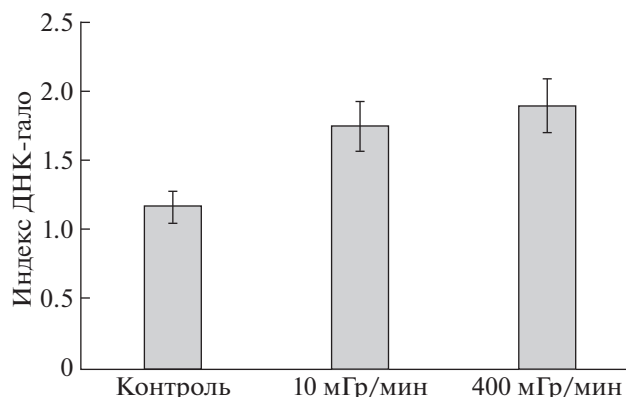


Рис. 4. Изменение степени фрагментации ДНК в клетках линии A549 в зависимости от мощности дозы.

КИНЕТИКА ИНДУКЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДР ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНОЙ МОЩНОСТЬЮ ДОЗЫ

Оценка количества ДР ДНК в клетках проводилась при помощи метода иммуноцитохимического окрашивания фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), обладающего высокой чувствительностью. Данный метод позволяет количественно оценить уровень ДР ДНК. Кроме того, клетки окрашивали иммуноцитохимически на белок RAD51, который является маркером репарации по пути ГР. Их оценку проводили спустя 1, 2, 4 и 24 часа после радиационного воздействия. Следует отметить, как уже сказано выше, что время облучения составляло 5 мин (400 мГр/мин) и 200 мин (10 мГр/мин).

При длительности облучения в 200 мин (мощность дозы 10 мГр/мин) в количестве фокусов γ H2AX в клетках линии A549 не установлено существенных изменений вплоть до 4 часов после радиационного воздействия, количество ДР ДНК сохранялось практически на одном уровне.

Клетки, облученные с мощностью дозы 400 мГр/мин, имели наибольшее количество фокусов на ядро клетки через час после облучения, однако в течение 2 и 4 часов после облучения количество фокусов значительно снижалось. Через 24 часа после облучения отмечали контрольные значения как в клетках, облученных с мощностью дозы 10 мГр/мин, так и в клетках, облученных с мощностью дозы 400 мГр/мин (рис. 5).

Полученные данные соответствуют результатам аналогичного эксперимента на фибробластах кожи человека [2], в котором было установлено, что максимум числа фокусов γ -H2AX образуется в течение первого часа после облучения при облучении с высокой мощностью дозы, а при облучении с низкой мощностью дозы количество фоку-

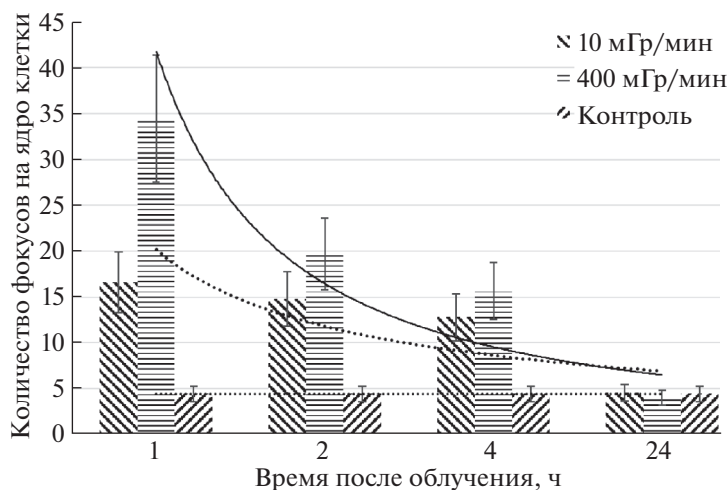


Рис. 5. Изменения количества фокусов γ -H2AX в клетках карциномы легкого человека A549 при облучении с высокой (400 мГр/мин) и умеренной (10 мГр/мин) мощностью облучения и без облучения (Контроль).

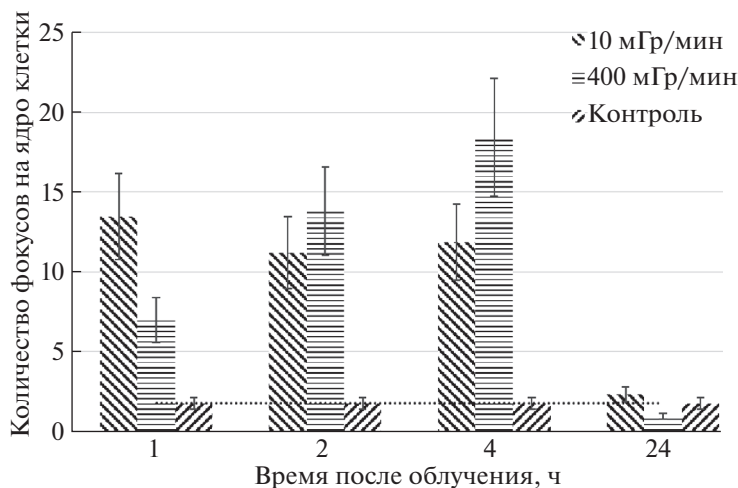


Рис. 6. Изменения количества фокусов RAD51 в клетках карциномы легкого человека A549 при облучении с высокой (400 мГр/мин) и умеренной (10 мГр/мин) мощностью облучения и без облучения (Контроль).

сов плавно уменьшается и достигает контрольных значений в течение 24 ч.

В случае острого облучения репарация ДНК осуществляется преимущественно по быстрому механизму НГСК. Во время этого процесса происходит “объединение” концов нитей ДНК до гомологичных последовательностей. В результате происходит потеря генетической информации с образованием делеций, достигающих размера в миллион пар оснований [6]. Поэтому крайне важно проводить оценку не только эффективности репарации ДНК по легированию ДР, но и оценку относительного вклада ДР отрепарированных путем НГСК и ГР. Соотношение НГСК и ГР как механизмов репарации ДР ДНК коррелирует с ра-

диочувствительностью клеток, подвергшихся воздействию ИИ, и является важным прогностическим параметром [5]. Именно поэтому также была проведена количественная оценка фокусов RAD51 как маркера ГР.

При анализе изменения числа фокусов RAD51 (маркеры ГР) в клетках линии A549 выявлено, что при длительности облучения 200 минут (мощность дозы 10 мГр/мин) в течение первых 4 часов после облучения количество фокусов меняется незначительно, а в клетках, облученных в течение 5 мин (мощность дозы 400 мГр/мин), наблюдали подъем этого показателя с пиком на 4 ч после облучения (рис. 6).

Отметим, что число фокусов в ядрах клеток экспериментальной группы, облученной при мощности дозы 400 мГр/мин, по прошествии 4 ч после воздействия ИИ было выше, чем в группе, подвергшейся пролонгированному облучению. Количество фокусов на ядро клетки спустя 24 часа после воздействия достигало контрольных значений, однако наблюдалась тенденция к снижению количества RAD51 в клетках, облученных с мощностью дозы 400 мГр/мин.

Подобный тип зависимости числа фокусов RAD51 наблюдается в результатах исследования, проведенного на фибробластах кожи человека [2]. В ходе этого исследования было отмечено постепенное возрастание числа фокусов до максимальных значений с последующим снижением при остром облучении, высокие значения количества фокусов при сравнении с контрольной группой при пролонгированном облучении. Подобные результаты могут быть объяснены более продолжительным воздействием ИИ с малой мощностью дозы на биологический объект. В таком случае, к моменту завершения облучения происходит активация процессов репарации по механизму ГР разрывов ДНК, индуцированных на начальных сроках облучения.

В ходе данного исследования уменьшение мощности дозы привело к неожиданному возрастанию количества фокусов RAD51, на основе чего можно сделать предварительный вывод об активном включении ГР в процесс репарации в случае облучения с низкой мощностью дозы по сравнению с облучением с высокой мощностью дозы.

Отличие фокусов RAD51 от фокусов γ H2AX заключается в том, что они присутствуют преимущественно в тех клетках, которые находятся в S и G₂ фазах клеточного цикла. Таким образом, увеличение среднего количества фокусов RAD51 может быть обусловлено не только активацией репарации по пути ГР, но и увеличением доли клеток в S/G₂ фазах и, как результат, S/G₂-M задержки (ареста) клеточного цикла. Увеличение среднего количества фокусов RAD51 в течение 2–4 ч после облучения, по всей видимости, обусловлено увеличением числа ДР ДНК, репарируемых по механизму ГР. С другой стороны, не исключено, что активизация ГР может быть ассоциирована с увеличением количества вторичных ДР ДНК, возникших в результате коллапса репликативных вилок.

В настоящее время считается, что ГР представляет собой механизм, осуществляющий более точную и корректную репарацию по сравнению с НГСК, т.к. в процессе него образуется меньшее количество точечных мутаций и хромосомных aberrаций [7]. Показанная в данной работе актив-

зация ГР при пролонгированном воздействии ИИ является, по всей видимости, одним из механизмов, обеспечивающих уменьшение негативных биологических последствий длительного воздействия ИИ и способствующих адаптации клеток к стрессовым воздействиям.

Повышенная активность ГР является механизмом выживания в нормальных и опухолевых клетках. Известно, что в опухолевых клетках отмечается гиперэкспрессия RAD51, что способствует их выживанию после облучения, поэтому RAD51 рассматривают как одну из важных мишеней при разработке радиосенсибилизаторов опухолей нового поколения [8].

Исходя из данных по ДР ДНК (γ H2AX), где значения соответствуют контрольным, можно заключить, что репарация остаточных (спустя 24 ч после облучения) повреждений идет и по другим механизмам. Остаточные повреждения ДНК являются неблагоприятными для дальнейшей судьбы клетки. Они могут привести к нестабильности генома (хромосомные aberrации, формирования микроядер и т.п.), что влечет за собой и гибель клетки, поэтому очень важно оценить репродуктивную выживаемость облученных клеток.

ОЦЕНКА КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ КЛЕТОК A549 ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНОЙ МОЩНОСТЬЮ ДОЗЫ

Тест на колониюобразующую способность клеток (клоногенный тест) является “золотым стандартом” в радиационной биологии. Он позволяет оценить репродуктивную выживаемость клеток после радиационного воздействия. При этом учитываются колонии, состоящие из 50 и более клеток.

В данном исследовании проводили анализ способности облученных с разной мощностью дозы и необлученных клеток линии A549 образовывать колонии. Выявили, что доля выживших облученных клеток была значительно ниже необлученных (рис. 7). При этом достоверных различий между группами клеток, облученными с мощностью дозы 10 мГр/мин и 400 мГр/мин, не было установлено.

Согласно полученным данным по остаточным фокусам ДР ДНК (рис. 5) к 24 ч после облучения нет достоверных различий между облученными и необлученными клетками. Клоногенный тест свидетельствует о снижении репродуктивной выживаемости практически в два раза. Видимо, это является результатом формирования неправильно отрепарированных повреждений ДНК, что, в итоге, приводит к проявлению нестабильности генома и гибели клеток. В данном эксперименте показано, что облучение в дозе 2 Гр как с более

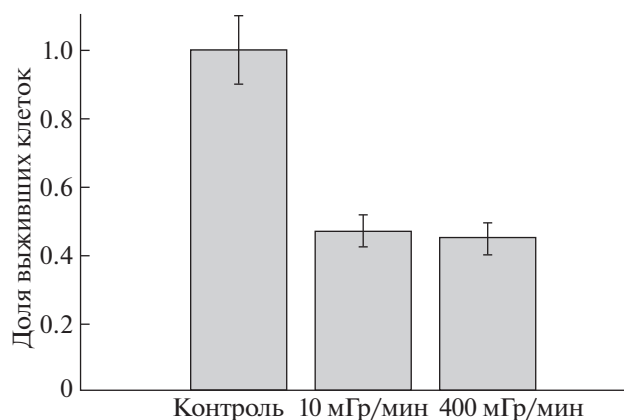


Рис. 7. Изменение доли выживших клеток линии A549 в зависимости от мощности дозы.

высокой (400 мГр/мин), так и с низкой (10 мГр/мин) мощностью дозы вызывает снижение репродуктивной выживаемости примерно на 50%, при этом достоверных отличий между группами облученных клеток не установлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено, что увеличение мощности дозы облучения клеток ведет к увеличению степени фрагментации ДНК.

Установлено, что репарация ДР ДНК при облучении с более низкой мощностью дозы (10 мГр/мин) происходит медленнее, чем при облучении с высокой мощностью дозы (400 мГр/мин).

Репарация ДР ДНК по механизму ГР происходит активнее в клетках, облученных с более низкой мощностью дозы (10 мГр/мин), что обусловлено длительностью радиационного воздействия (несколько часов). В клетках, облученных с высокой мощностью дозы (400 мГр/мин) преобладают другие механизмы репарации ДНК.

Выявлено, что клоногенная способность опухолевых клеток после облучения с использованными мощностями доз (10 и 400 мГр/мин) значительно снижается в сравнении с необлученными клетками, однако различий между клетками, облученными с разной мощностью дозы, выявлено не было.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Литвинов С.В. Основные пути репарации двойных разрывов геномной ДНК и взаимодействия с ними // Цитология и генетика, 2014. Т. 48. № 3. С. 64–77.
2. Озеров И.В., Еремин П.С., Осипов А.Н., Еремин И.И., Цветкова А.Д., Гусева С.С., Иванова К.Ю., Гавриленко О.И., Пустовалова М.В., Сметанина Н.М., Грехова А.К., Лазарева Н.П., Пулин А.А., Максимова О.А., Гордеев А.В., Бушманов А.Ю., Котенко К.В. Особенности изменения числа фокусов белков γH2AX и RAD51 в фибробластах кожи человека, подвергавшихся пролонгированному воздействию низкоинтенсивного рентгеновского излучения // Саратовский научно-медицинский журн., 2014. Т. 10. № 4.
3. Kakarougkas A., Jeggo P.A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism // The British journal of radiology, 2014. V. 87. № 1035. P. 20130685.
4. Kotenko, K.V., Bushmanov A.Y., Ozerov I.V., Guryev D.V., Anchishkina N.A., Smetanina N.M., Arkhangelskaya E.Y., Vorobyeva N.Y., Osipov A.N. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ-radiation with different dose rates // International journal of molecular sciences, 2013. V. 14. № 7. P. 13719–13726.
5. Lim Y.C., Roberts T.L., Day B.W., Stringer B.W., Kozlov S., Fazry S., Bruce Z.C., Ensbeys K.S., Walker D.G., Boyd A.W., Lavin M.F. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells // Molecular oncology, 2014. V. 8. № 8. P. 1603–1615.
6. Sankaranarayanan K., Taleei R., Rahmanian S., Nikjoo H. Ionizing radiation and genetic risks. XVII. Formation mechanisms underlying naturally occurring DNA deletions in the human genome and their potential relevance for bridging the gap between induced DNA double-strand breaks and deletions in irradiated germ cells // Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2013. V. 753. № 2. P. 114–130.
7. Sasaki M.S., Takata M., Sonoda E., Tachibana A., Takeda S. Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA inter-strand crosslinks // Cytogenetic and genome research, 2004. V. 104. № 1–4. P. 28–34.
8. Ward A., Khanna K.K., Wiegman A.P. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51 // Cancer treatment reviews, 2015. V. 41. № 1. P. 35–45.

Peculiarities of the Biological Effects Formation in Cultured Human Tumor A549 Cells Exposed to Ionizing Radiation with Different Dose Rates

V. A. Stelmukhova^{a,b}, A. A. Tsishnatti^{a,b,#}, S. M. Rodneva^b, N. M. Smetanina^b, Y. A. Fedotov^b, and D. V. Guryev^b

^aNational Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

^bBurnasyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 123098 Russia

[#]e-mail: AATsishnatti@mephi.ru

Received July 27, 2022; revised August 18, 2022; accepted August 23, 2022

Abstract—The influence of the dose rate factor of ionizing radiation on the induction and repair efficiency of double-strand breaks (DSBs) of DNA has been studied with further prognostic analysis of the survival of human tumor cells. A549 cells have been exposed to X rays at a dose of 2 Gy at dose rates of 10 and 400 mGy/min. The degree of DNA fragmentation, immunocytochemical staining for γ H2AX and RAD51 proteins and clonogenic test have been conducted. It has been found that the DNA DSB repair velocity under irradiation with a lower dose rate (10 mGy/min) is lower than that under irradiation with a high dose rate (400 mGy/min) and predominantly passes through the mechanism of homologous recombination. Other DNA DSB repair mechanisms predominate in cells irradiated at a higher dose rate (400 mGy/min). The clonogenic ability of tumor cells after irradiation with the used dose rates (10 and 400 mGy/min) decreases significantly compared with non-irradiated cells, but no significant differences have been observed between cells irradiated with different dose rates.

Keywords: A549, human lung carcinoma, DNA double-strand breaks, dose rate, γ H2AX, RAD51, degree of DNA fragmentation, clonogenic test

DOI: 10.56304/S2304487X22030105

REFERENCES

1. Litvinov S.V. Osnovnye puti reparacii dvoynnyh razryvov genomnoj DNK i vzaimodejstviya s nimi [Main pathways for repair of double breaks in genomic DNA and interaction with them]. *Tsitologiya i genetika*, 2014, vol. 48, no. 3, pp. 64–77. (in Russian)
2. Ozerov I.V., Eremin P.S., Osipov A.N., Eremin I.I., Tsvetkova A.D., Guseva S.S., Ivanova K.Y., Gavrilenko O.I., Pustovalova M.V., Smetanina N.M., Grekhova A.K., Lazareva N.P., Pulin A.A., Maksimova O.A., Gordeev A.V., Bushmanov A.Y., Kotenko K.V. Osobennosti izmeneniya chisla fokusov belkov γ H2AX i RAD51 v fibroblastah kozhi cheloveka, podvergavshisya prolongirovannomu vozdejstviyu nizkointensivnogo rentgenovskogo izlucheniya xFeatures of changes in the number of foci of γ H2AX and Rad51 proteins in human skin fibroblasts subjected to prolonged exposure to low-intensity X-ray radiation. *Saratovskij nauchno-meditsinskij zhurn*, 2014, vol. 10, no. 4. (in Russian)
3. Kakarougkas A., Jeggo P.A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *The British journal of radiology*, 2014, v. 87, no. 1035, pp. 20130685.
4. Kotenko, K.V., Bushmanov A.Y., Ozerov I.V., Guryev D.V., Anchishkina N.A., Smetanina N.M., Arkhangelskaya E.Y., Vorobyeva N.Y., Osipov A.N. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ -radiation with different dose rates. *International journal of molecular sciences*, 2013, vol. 14, no. 7, pp. 13719–13726.
5. Lim Y.C., Roberts T.L., Day B.W., Stringer B.W., Kozlov S., Fazry S., Bruce Z.C., Ensby K.S., Walker D.G., Boyd A.W., Lavin M.F. Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Molecular oncology*, 2014, vol. 8, no. 8, pp. 1603–1615.
6. Sankaranarayanan K., Taleei R., Rahmanian S., Nikjoo H. Ionizing radiation and genetic risks. XVII. Formation mechanisms underlying naturally occurring DNA deletions in the human genome and their potential relevance for bridging the gap between induced DNA double-strand breaks and deletions in irradiated germ cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2013, vol. 753, no. 2, pp. 114–130.
7. Sasaki M.S., Takata M., Sonoda E., Tachibana A., Takeda S. Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA inter-strand crosslinks. *Cytogenetic and genome research*, 2004, vol. 104, no. 1–4, pp. 28–34.
8. Ward A., Khanna K.K., Wiegman A.P. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51. *Cancer treatment reviews*, 2015, vol. 41, no. 1, pp. 35–45.