
ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 577.2.043:539.1

РАЗЛИЧИЯ ЭФФЕКТОВ ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ MOLT-4 И ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

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

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск¹

Томский государственный университет²

Институт сильноточной электроники СО РАН, г. Томск³

634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10, e-mail: stas.vasilyev@gmail¹

Разработаны источники, способные генерировать импульсно-периодическое рентгеновское излучение (ИПРИ) в наносекундном диапазоне с возможностью изменения частоты повторения импульсов и дозы за импульс. Целью настоящего исследования стал анализ воздействия ИПРИ на уровень двуниевых разрывов ДНК в опухолевых и нормальных клетках человека в условиях *in vitro*. Для оценки уровня двуниевых разрывов ДНК и эффективности их репарации использовался метод анализа флуоресцентных фокусов белков репарации ДНК γ H2AX и 53BP1 в клетках опухолевой линии MOLT-4, имеющей лимфобластное происхождение, после воздействия ИПРИ в условиях *in vitro*. Наибольший уровень фокусов γ H2AX и 53BP1 через 18 ч после воздействия, являющийся маркером эффективности репарации ДНК, в клетках линии MOLT-4 отмечался при воздействии ИПРИ с частотой повторения импульсов 8 имп./с, при которой ранее в лимфоцитах наблюдалось наименьшее количество двуниевых разрывов ДНК. Полученные результаты указывают, что использование ИПРИ с различными частотами повторения импульсов может позволить дифференцированно воздействовать на опухолевые клетки, незначительно повреждая при этом нормальные клетки человека.

Ключевые слова: импульсно-периодическое рентгеновское излучение, малые дозы, гиперрадиочувствительность, фокусы γ H2AX и 53BP1, двуниевые разрывы ДНК.

DIFFERENT EFFECTS OF PULSED X-RAYS IN MOLT-4 CELL LINE AND HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

S.A. Vasilyev¹, A.A. Belenko², O.P. Kutenkov³, M.A. Bolshakov^{2,3}, I.N. Lebedev¹, V.V. Rostov³

Institute of Medical Genetics SB RAMS, Tomsk¹, Tomsk State University²,

Institute of High-Current Electronics SB RAS, Tomsk³

10, Naberezhnaya r. Ushaiki, 10, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: stas.vasilyev@gmail¹

Effects of ionizing radiation registered in cells after low dose irradiation are still poorly understood. Thus, the aim of this study was to analyze effects of pulsed X-rays on level of radiation-induced DNA double-strand breaks and their repair kinetics in cancer and normal human cells *in vitro*. Analysis of radiation-induced γ H2AX and 53BP1 repair foci in MOLT-4 cells with lymphoblastic origin was used for assessment of DNA double-strand breaks (DSB) in these cells. Number of residual radiation-induced γ H2AX and 53BP1 foci at 18 h after irradiation depended on frequency of X-ray pulses: at 8 pulses per second effect was highest in MOLT-4 cells and lowest in peripheral blood lymphocytes. It suggests that pulsed X-rays with various frequencies could be used for target influence on cancer cells being less deleterious for normal human cells.

Key words: pulsed X-rays, low doses, hyper radiosensitivity, γ H2AX and 53BP1 foci, DNA double-strand breaks.

Эффекты малых доз и малых мощностей доз ионизирующего излучения представляют интерес как с точки зрения потенциальной опасности есте-

ственных и искусственных источников радиации, так и благодаря потенциальной возможности их использования в клинике [2, 8]. В мировой лите-

ратуре во многих случаях, вследствие недостатка данных, касающихся повреждающего влияния собственно малых доз ионизирующего излучения, предполагаемые эффекты малых доз получаются путем экстраполяции результатов, установленных в экспериментах с воздействием больших доз радиации [6]. Однако результаты многочисленных исследований указывают на существенные различия эффектов, наблюдаемых при воздействии малых и высоких доз радиации на биологические объекты. В частности, имеются данные об изменении профилей экспрессии генов и белков [7], а также посттрансляционной модификации белков [12, 13]. Таким образом, выявление механизмов возникновения повреждений ДНК в клетках при воздействии радиации в малых дозах даст возможность модулировать радиочувствительность клеток в этом диапазоне доз, открывая широкий простор для создания новых методов низкодозовой противоопухолевой лучевой терапии.

Дополнительные потенциальные возможности открываются при использовании импульсного характера подведения дозы ионизирующего излучения. Так, применительно к воздействию импульсно-периодического рентгеновского излучения (ИПРИ) в малых дозах с частотами повторения импульсов в диапазоне 8–22 имп./с показано эффективное ингибирование пролиферативной активности клеток и изменение уровня синтеза ДНК и РНК в опухолевых клетках мастоцитомы Р-815 и карциномы Эрлиха [4]. Кроме того, интересным аспектом является генотоксическое воздействие ИПРИ на клетки человека. Наиболее чувствительной методикой, позволяющей оценить уровень генотоксических эффектов в клетках на основе анализа уровня двунитевых разрывов ДНК, является иммунофлуоресцентная детекция фокусов белков γ H2AX и 53BP1 [5]. Они представляют собой комплексы из сотен молекул белков, образующиеся в клетке вокруг двунитевых разрывов ДНК и участвующие в репарации ДНК и активации контрольных точек клеточного цикла. Ранее при проведении анализа уровня фокусов белков γ H2AX и 53BP1 отмечалась гиперрадиочувствительность лимфоцитов периферической крови человека при воздействии ИПРИ в суммарных дозах от 12 до 32 мГр и так называемая индуцированная радиорезистентность при воздействии ИПРИ в дозе 72 мГр [3]. Учитывая значительные отличия эффектов ра-

диации в нормальных и опухолевых клетках человека и потенциальную возможность использования источников ИПРИ в низкодозовой лучевой терапии опухолей, было изучено влияние ИПРИ в диапазоне малых доз на уровень двунитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MOLT-4. В качестве сравнения использовались данные из проведенного ранее исследования влияния ИПРИ на лимфоциты периферической крови [3].

Материал и методы

Для характеристики влияния ИПРИ на опухолевые клетки были использованы клетки линии MOLT-4 [9]. Будучи полученными из Т-клеточной опухоли, клетки линии MOLT-4 обладают многими характеристиками, сходными с лимфоцитами периферической крови, что облегчает сравнение результатов.

Клетки выращивались в суспензионной культуре в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, Sigma) до концентрации 2×10^6 клеток/мл, после чего производился пересев клеток в свежую среду. Таким образом, клетки постоянно поддерживались в экспоненциальной фазе роста. Для проведения эксперимента клетки концентрировались до 3×10^6 клеток/мл в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, разделялись по 3 мл в пластиковые центрифужные пробирки (Greiner) и транспортировались во льду для облучения.

В качестве источника ИПРИ использовалось тормозное излучение электронов сильноточного электронного пучка на аноде ускорителя Sinus 150 (ускоряющее напряжение 260 кВ, сила тока 4 кА, длительность импульса 4 нс). Во время облучения пробирки с культурой клеток размещались на определенном расстоянии от анода ускорителя, что обеспечивало требуемую дозу. Измерения доз производились на различных расстояниях от коллектора (3–70 см) вдоль оси системы с использованием термолюминесцентного дозиметра КДТ-02М (Россия) и электростатического дозиметра с кварцевым волокном серии «Agrow-Tech» модель 138-S (США) [1]. Клетки подвергались воздействию 4000 импульсов ИПРИ с частотами повторения импульсов 8, 13 и 25 имп./с с дозами 0,003; 0,008; 0,018; 0,04 и 0,08 мГр/имп.

После облучения клетки транспортировали во льду и инкубировали в термостате при 37°C для оценки динамики фокусов через 30 мин, 2 ч и 18 ч

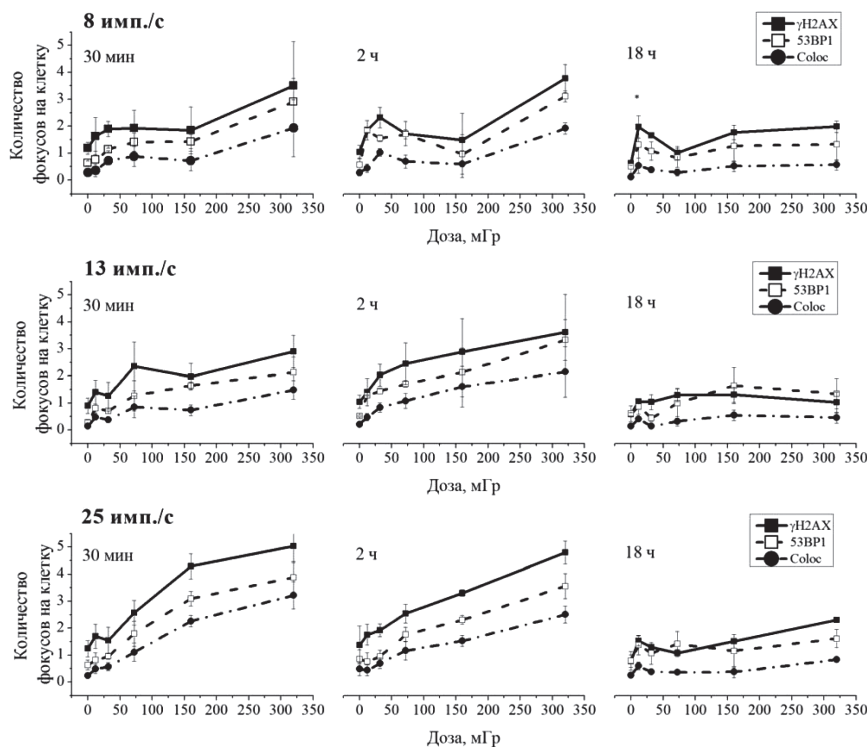


Рис. 1. Дозовая зависимость уровня фокусов γ H2AX, 53BP1 и колокализированных фокусов обоих белков через 30 мин, 2 ч и 18 ч в клетках опухолевой линии MOLT-4 после воздействия ИПРИ в условиях *in vitro*. Данные представлены в виде средних арифметических значений со стандартным отклонением

репарации ДНК с помощью иммунофлуоресценции. Протокол фиксации клеток, приготовления препаратов и иммунофлуоресцентной оценки аналогичен использованному ранее на лимфоцитах периферической крови человека [3]. Были использованы следующие первичные антитела: моноклональные мышинные антитела к белку γ H2AX (Novus) и поликлональные антитела кролика к белку 53BP1 (Novus). Вторичными антителами, несущими флуорохромы, были мышинные антитела к иммуноглобулинам кролика (Novus), конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), и кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши (Novus), конъюгированные с родамином.

Статистический анализ дозовой и временной зависимостей количества фокусов проводился с использованием дисперсионного анализа. В дальнейшем для множественных сравнений количества фокусов использовался критерий Шеффе. Для проведения анализа изменений количества фокусов во времени использовался парный критерий Стьюдента. Все статистические процедуры были

проведены с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (Statsoft). Эксперимент был проведен в 3 повторах.

Результаты и обсуждение

В отсутствие воздействия ИПРИ фоновый уровень фокусов белков γ H2AX и 53BP1 в опухолевых клетках MOLT-4 был сравним на всех временных точках и составлял от 0,9 до 1,2 и от 0,3 до 0,6 фокусов на клетку, соответственно. Таким образом, количество спонтанных двунитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MOLT-4 значительно не превышало соответствующий уровень в лимфоцитах периферической крови человека [3]. Кроме того, обнаруженный уровень двунитевых разрывов ДНК был сравним с полученным в другом исследовании с использованием клеток линии MOLT-4 [10].

Через 30 мин после воздействия ИПРИ отмечалось возрастание количества фокусов γ H2AX и 53BP1 в зависимости от дозы (рис. 1). При этом наблюдались статистически значимые различия между количеством радиационно-индуцированных

СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. 2013. № 2 (56)

фокусов через 30 мин после воздействия ИПРИ с различными частотами повторения импульсов в дозах 32 мГр (фокусы 53BP1, ANOVA, $p < 0,01$) и 160 мГр (фокусы 53BP1 и колокализованные фокусы γ H2AX и 53BP1 ANOVA, $p < 0,01$) (рис. 1). В первом случае наибольшее количество фокусов 53BP1 было обнаружено в клетках после воздействия ИПРИ с частотой повторения импульсов 8 имп./с. Наоборот, при воздействии ИПРИ в дозе 160 мГр больше всего фокусов 53BP1 и колокализованных фокусов γ H2AX и 53BP1 отмечалось для частоты повторения импульсов 25 имп./с.

Динамика фокусов γ H2AX и 53BP1 в опухолевых клетках линии MOLT-4 была сходной с отмечавшейся динамикой в лимфоцитах периферической крови [3]. Уровень фокусов при воздействии большинства комбинаций частот повторения импульсов и доз за импульс ИПРИ значимо не изменялся между 30 мин и 2 ч после облучения (рис. 1). Хотя в некоторых случаях наблюдалось статистически значимое повышение количества фокусов при увеличении времени после воздействия с 30 мин до 2 ч: фокусы 53BP1 при воздействии в дозе 32 мГр при 13 имп./с (парный критерий Стьюдента, $p = 0,016$) и колокализованные фокусы γ H2AX и 53BP1 при воздействии в дозе 32 мГр при 8 имп./с (парный критерий Стьюдента, $p = 0,011$). Данный результат подтверждает более высокую биологическую эффективность воздействия ИПРИ в дозе 32 мГр, обнаруженную ранее на лимфоцитах периферической крови [3]. Следует отметить, что в клетках линии MOLT-4 сравнительное возрастание уровня двунитевых разрывов ДНК при воздействии ИПРИ в дозе 32 мГр по сравнению с другими дозами ИПРИ отмечалось к 2 ч после облучения, что указывает на более медленную динамику формирования фокусов вокруг двунитевых разрывов ДНК в клетках MOLT-4, в отличие от лимфоцитов периферической крови, в которых отклонения от линейной дозовой зависимости при ИПРИ в дозе 32 мГр отмечались через 30 мин после облучения [3]. В то же время для обоих типов клеток отмечалось статистически значимое генотоксическое действие ИПРИ при суммарной дозе 12 мГр ($p < 0,05$). При этом в обоих типах клеток фиксировалось наличие бимодальной дозовой зависимости уровня фокусов белков γ H2AX и 53BP1, отклоняющейся от линейной.

При проведении анализа динамики фокусов во времени от 30 мин до 18 ч после облучения

с помощью парного критерия Стьюдента было обнаружено, что статистически значимое уменьшение уровня фокусов отмечается лишь для ряда комбинаций частот повторения импульсов и доз ИПРИ: колокализованные фокусы при 160 мГр, 13 имп./с ($p = 0,00007$); фокусы γ H2AX, 53BP1 и колокализованные фокусы при 320 мГр, 13 имп./с ($p = 0,012$, $p = 0,0002$ и $p = 0,021$, соответственно); фокусы γ H2AX и колокализованные фокусы при 160 мГр, 25 имп./с ($p = 0,046$ и $p = 0,043$, соответственно); колокализованные фокусы при 320 мГр, 25 имп./с ($p = 0,039$).

Таким образом, к 18 ч после облучения статистически значимо уменьшается лишь уровень двунитевых разрывов ДНК, вызванных воздействием ИПРИ в дозах более 160 мГр. При этом остаточный уровень фокусов после воздействия ИПРИ со всеми использованными параметрами был значимо выше соответствующего контрольного уровня через 18 ч после облучения ($p < 0,05$). Таким образом, учитывая повышенный уровень двунитевых разрывов ДНК при воздействии ИПРИ в дозе менее 160 мГр на фоне отсутствия статистически значимого снижения количества радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX и 53BP1 к 18 ч, можно констатировать более низкую активность репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных ИПРИ в дозе меньше 160 мГр, по сравнению с эффектами более высоких доз.

Важным показателем является остаточный уровень двунитевых разрывов ДНК через 18 ч после воздействия, являющийся маркером эффективности репарации ДНК. Ранее наибольший уровень фокусов γ H2AX и 53BP1 в лимфоцитах периферической крови человека через 18 ч после облучения отмечался при воздействии ИПРИ с частотой повторения импульсов 13 имп./с за счет выраженной гиперчувствительности в диапазоне доз 12–32 мГр [3]. Клетки линии MOLT-4, напротив, оказались более чувствительны к воздействию ИПРИ с частотой повторения импульсов 8 имп./с, при которой в лимфоцитах наблюдалось наименьшее количество двунитевых разрывов ДНК. Обнаруженные различия в чувствительности опухолевых и нормальных клеток, вероятно, обусловлены нарушениями окислительного метаболизма в опухолевых клетках линии MOLT-4, изменяющими параметры гиперчувствительности этих клеток к воздействию радиации в малых дозах относительно

нормальных лимфоцитов периферической крови человека. Наличие значимого уровня остаточных нерепарированных двуниевых разрывов ДНК в клетках через 18 ч после воздействия ИПРИ подтверждается литературными данными о повышенной чувствительности клеток линии MOLT-4 к воздействию ионизирующего излучения с низкой мощностью дозы (3,9 мГр/мин) [10, 11].

Полученные результаты о различном характере ответа клеток линии MOLT-4 и лимфоцитов периферической крови человека на воздействие ИПРИ с различными частотами повторения импульсов указывают на то, что возможно подобрать режимы ИПРИ, повреждающие в первую очередь опухолевые клетки и незначительно влияющие на нормальные клетки.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 12-04-00893 а, 12-04-32046 мол а и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» № 8596, АВЦП № 22.1/13778.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артемов К.П., Ельчанинов А.А., Кутенков О.П. и др. Импульсно-периодический источник рентгеновского излучения // Приборы и техника эксперимента. 2004. № 5. С. 166–167.
2. Булдаков М.А., Литвяков Н.В., Климов И.А. и др. Влияние низкодозового импульсно-периодического рентгеновского излучения на рост и метастазирование карциномы легких Льюис // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 6 (48). С. 47–51.
3. 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. С. 31–38.
4. Литвяков Н.В., Ростов В.В., Булдаков М.А. и др. Ингибирование пролиферации опухолевых клеток импульсно-периодическим рентгеновским излучением // Сибирский онкологический журнал. 2006. № 1 (17). С. 24–31.
5. Belyaev I.Y. Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry // Mutat. Res. 2010. Vol. 704 (1–3). P. 132–141.
6. Brenner D.J., Sachs R.K. Estimating radiation-induced cancer risks at very low doses: rationale for using a linear no-threshold approach // Radiat. Environ. Biophys. 2006. Vol. 44. P. 253–256.
7. Ding L.H., Shingyoji M., Chen F. et al. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses // Radiat. Res. 2005. Vol. 164. P. 17–26.
8. Farooque A., Mathur R., Verma A. et al. Low-dose radiation therapy of cancer: role of immune enhancement // Expert Rev. Anticancer Ther. 2011. Vol. 11 (5). P. 791–802.
9. Greenberg J.M., Gonzalez-Sarmiento R., Arthur D.C. et al. Immunophenotypic and cytogenetic analysis of Molt-3 and Molt-4: human T-lymphoid cell lines with rearrangement of chromosome 7 // Blood. 1988. Vol. 72. P. 1755–1760.
10. Rezacova M., Tichy A., Vavrova J. et al. Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4? // Leuk. Res. 2008. Vol. 32. P. 1259–1267.
11. Vavrova J., Rezacova M., Vokurkova D. et al. Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate // Physiol. Res. 2004. Vol. 53. P. 335–342.
12. Yang F., Stenoien D.L., Strittmatter E.F. et al. Phosphoproteome profiling of human skin fibroblast cells in response to low- and high-dose irradiation // J. Proteome Res. 2006. Vol. 5. P. 1252–1260.
13. Yang F., Waters K.M., Miller J.H. et al. Phosphoproteomics profiling of human skin fibroblast cells reveals pathways and proteins affected by low doses of ionizing radiation // PLoS One. 2010. Vol. 5. e. 14152.

Поступила 30.11.12