

УДК 575.224.46: 577.346

**СРАВНЕНИЕ ДВУХ СУБЛИНИЙ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПО  
УРОВНЮ ЭНДОГЕННЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ РАДИАЦИЕЙ  
ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНОМА**

**Н.В. Савина<sup>1</sup>, О.В. Даливеля<sup>1</sup>, Т.Д. Кужир<sup>1</sup>, И. Градска<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси  
Беларусь, 220027, Минск, ул. Академическая, 27,  
e-mail: O.Dalivelya@igc.bas-net.by*

<sup>2</sup>*Институт ядерной химии и технологии, Варшава, Польша*

**Реферат**

УДК 575.224.46: 577.346

В работе дана сравнительная характеристика двух сублиний лимфомы мыши L5178Y (LY-R и LY-S) по выживаемости и пролиферативной активности клеток, по уровню эндогенных и индуцированных рентгеновскими лучами двунитевых разрывов ДНК и микроядер. Показано, что облучение снижает выживаемость клеток в сублинии LY-S и подавляет их пролиферативную активность. Частота эндогенных повреждений ДНК в сублинии LY-S выше, а скорость и эффективность репарации индуцированных повреждений ДНК – ниже, чем в сублинии LY-R. Частота спонтанных и индуцированных облучением микроядер в сублинии LY-S также достоверно повышается. Таким образом, доказана более высокая радиочувствительность сублинии LY-S, обусловленная наличием дефекта репарации двунитевых разрывов ДНК.

Табл.3. Ил.2. Библиогр. 8 назв.

Savina N.V., Dalivelya O.V., Kuzhir T.D., Gradska I. **The comparison of two sublines of mammalian cells by the level of endogenous and radiation-induced genome damage**

The comparative characteristics of two murine lymphoma sublines L5178Y (LY-R and LY-S) by cell survival and proliferation, the level of endogenous and X-ray-induced DNA double strand breaks and micronuclei is presented. Irradiation was shown to decrease cell survival and to inhibit their proliferation in the subline

LY-S. The frequency of endogenous DNA damage was higher, and repair efficiency of damaged DNA was lower in the subline LY-S as compared to LY-R. The frequency of spontaneous and X-ray-induced micronuclei also significantly increased in the subline LY-S. Thus, it was revealed higher radio-sensitivity of the subline LY-S due to deficient repair of DNA double strand breaks.

**Введение.** Резко и быстро меняющиеся условия окружающей среды вследствие ее загрязнения приводят к нарушениям структуры и функций генома, что отражается на жизнедеятельности отдельных клеток и организма в целом. Мутагены окружающей среды индуцируют специфические аддукты [1], причем некоторые из них расцениваются как ранние молекулярные маркеры канцерогенеза и других патологических состояний [2]. Характерно, что в экспериментальных моделях на животных спектры аддуктов ДНК существенно не различаются при спорадическом и индуцированном опухолеобразовании [3], что позволяет предположить роль спонтанного (фонового) мутагенеза в инициации рака. ДНК, модифицированная под влиянием экзогенных или эндогенных мутагенов, подвергается репарации, а нерепарированные изменения становятся источником мутаций и хромосомных повреждений. Аберрации хромосом, микроядра и другие цитогенетические нарушения в соматических клетках также относятся к числу ранних маркеров канцерогенеза, тогда как мутации могут изменять экспрессию или полностью нарушать функцию единичных генов на более поздних его стадиях [2]. Уже вполне ясен вклад повреждений ДНК и тонких механизмов, обеспечивающих клеточный ответ на генотоксичный стресс, в развитие патологии. Поэтому современные методы профилактики и эффективного лечения различных, в том числе злокачественных заболеваний базируются на изучении внутриклеточных процессов и отдельных сигнальных молекул, которые могли бы служить мишенями превентивного и терапевтического воздействия. Культуры клеток млекопитающих являются хорошей моделью для этих целей. Данное исследование посвящено сравнению двух сублиний лимфомы мыши *L5178Y* (*LY-R* и *LY-S*) по различным параметрам, включая реакцию их генома на рентгеновское излучение.

**Материалы и методы.** Изучены две сублинии лимфомы мыши *L5178Y* (*LY-R* и *LY-S*), для которых ранее была показана дифференциальная чувствительность к ионизирующей радиации и другим ДНК повреждающим агентам [4, 5]. Клетки культивировались в среде Фишера с добавлением 10% инактивированной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для оценки выживаемости использовали суспензии с плотностью клеток 25×10<sup>3</sup>/мл (для вариантов

без облучения) и  $100 \times 10^3$ /мл (для вариантов с облучением). Плотность клеточной суспензии для проведения нейтрального гель-электрофореза одиночных клеток (*Comet-assay*) была не менее  $400 \times 10^3$ /мл.

ДНК-повреждения и цитогенетические нарушения индуцировали рентгеновскими лучами. При изучении выживаемости клеток и для индукции микроядер (МЯ) использовали эквивалентные по повреждающему эффекту дозы облучения – 1 Gy для линии LY-S и 2 Gy для LY-R. Для индукции повреждений ДНК применялась одинаковая доза облучения – 10 Gy.

Оценка выживаемости клеток проведена с использованием стандартного метода окраски трипановым синим. Контрольные и облученные клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной телячьей сыворотки в течение 48 ч. После инкубации к образцу клеток добавляли раствор красителя в конечной концентрации 0,2 г/л. Анализ выживаемости проводили под микроскопом с помощью гемоцитометра Бюркера. Учитывали соотношение живых и мертвых клеток. Мертвые клетки идентифицировались как округлые клетки без видимого повреждения мембраны, окрашенные в голубой цвет.

Для оценки повреждений ДНК использован модифицированный метод нейтрального гель-электрофореза единичных клеток, позволяющий определять двойные разрывы ДНК [6]. Клеточные суспензии (опытные и контрольные) были смешаны с равным объемом низкоплавкой агарозы. 100  $\mu$ л полученной смеси наносили на предметное стекло с заранее наслоенной 0,5% нормальной агарозой. Образец накрывали покровным стеклом и выдерживали на льду до образования геля. Лизис клеток проводили в течение 1 часа при 4°C в темноте в лизирующем растворе (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% N-lauroylsarcosine, 0,5% Triton X-100, 10% DMSO) при pH 9,5. По окончании лизиса препараты трижды отмывались в буфере для электрофореза (300 mM sodium acetate, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3). Электрофорез проводили в горизонтальной камере в течение 1 часа при 14 V (0,5 V/cm, 11-12 mA) при 8°C в темноте. После электрофореза препараты промывали нейтрализующим раствором (0,4 M Tris, pH 7,5), высушивали и окрашивали 1  $\mu$ M DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride). На каждом препарате просчитывали 50 комет. Анализ проводили с помощью оригинальной программы Comet v.3.1 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) под флуоресцентным микроскопом. В качестве основного показателя при оценке повреждений ДНК использовали «момент хвоста» (*tail moment*), вычисленный из длины хвоста, умноженной на процент ДНК в хвосте.

Цитогенетические нарушения учитывали по частоте МЯ в клетках, стимулированных к делению цитохалазином. Материал фиксировали через

16 и 24 ч культивирования клеток после облучения. МЯ учитывали в двуядерных клетках с соблюдением всех необходимых требований к тесту [7].

Результаты представляют средние значения не менее трех повторностей, статистическая обработка данных проводилась с помощью стандартного пакета программ *Microsoft Excel-2000*. Достоверность различий между вариантами определялась по критериям *t*-Стьюдента и  $\chi^2$ .

**Результаты и обсуждение.** Данные сравнения этих клеточных линий по выживаемости клеток представлены в табл. 1. Видно, что спонтанная частота мертвых клеток колебалась от 1,1 до 2,1% в сублиниях *LY-S* и *LY-R*, однако их реакция на облучение существенно различалась.

Таблица 1. Выживаемость облученных и необлученных клеток *LY-R* и *LY-S*

Вариант опыта	Линия <i>LY-R</i>			Линия <i>LY-S</i>		
	Проанализировано клеток	Относительное число клеток	Частота мертвых клеток, %	Проанализировано клеток	Относительное число клеток	Частота мертвых клеток, %
Контроль	2578	1	2,13±0.20	5470	1	1,13±0.13
2 Гр / 1 Гр	2568	0,996	5,30±0.19	5154	0,942	10,75±0.13*

Примечание. \* Различия между линиями достоверны при  $P < 0.01$

Определенный интерес представляет показатель относительного числа клеток (отношение количества клеток «контроль/облучение»), который не изменялся под влиянием облучения клеток *LY-R* и слегка снижался в линии *LY-S* (табл. 1). Отсутствие влияния рентгеновского излучения в исследованной дозе (2 Gy) на рост клеток доказано и во второй серии экспериментов с линией *LY-R*: отношение клеток после облучения к контролю в этом случае также приближалось к 1. На этом фоне отмечено явное (в 2 раза) увеличение частоты мертвых клеток *LY-S* по сравнению с линией *LY-R*, что свидетельствует о повышенной чувствительности линии *LY-S* к ионизирующей радиации.

Частоты эндогенных и индуцированных двунитевых разрывов ДНК, оцененных методом ДНК-комет, представлены в табл. 2. Повреждения в облученных клетках определяли на 0, 15, 60 и 120 мин. после воздействия рентгеновских лучей. Эндогенные повреждения учитывались на 0 и 120 мин. В таблице представлены средние частоты эндогенных повреждений ДНК и

максимальный уровень индуцированных повреждений, соответствующий 0 мин. исследования.

Таблица 2. Влияние X-лучей на частоту повреждений ДНК в клетках лимфомы

Вариант опыта	Линия <i>LY-R</i>	Линия <i>LY-S</i>	<i>t</i> ; <i>P</i> *
	Момент хвоста	Момент хвоста	
Контроль	8,73±0,1	11,11±0,37	4,96;<0.0001
10 Гр	36,77±1,46	29,82±1,49	3,34; <0,001

Примечание. \*Представлены значения, отражающие различия между линиями

Уровень эндогенных двунитевых разрывов ДНК в линии *LY-S* был достоверно выше, чем в линии *LY-R*, но после облучения наблюдалась противоположная тенденция. Однако снижение частоты индуцированных первичных повреждений ДНК в линии *LY-S* может оказаться мнимым из-за повышенной в 2 раза гибели облученных клеток, приводящей к элиминации этих повреждений из клеточной популяции.

Последовательный анализ ДНК-повреждений в течение 120 мин. после облучения клеток позволил проследить за процессом репарации ДНК. Данные представлены на рис. 1. Видно, что за первые 15 мин. репарируется около половины (47,78%) индуцированных двунитевых разрывов ДНК в линии *LY-R* и только треть (33,94%) в линии *LY-S*. Следовательно, скорость воссоединения двунитевых разрывов выше в линии *LY-R*, о чем свидетельствуют и уравнения, описывающие зависимость «время-эффект». К концу культивирования клеток уровень индуцированных повреждений ДНК снижался до контрольных значений (до 9,25±0,35 и 11,02±0,52 в сублиниях *LY-R* и *LY-S* соответственно), при этом эффективность репарации ДНК за 120 мин составляла 75% для первой и 63% для второй сублинии. В совокупности эти данные указывают на подавление репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках *LY-S* по сравнению с клетками *LY-R*.

Следующим этапом было изучение клеточного деления (пролиферации) и частоты цитогенетических повреждений (МЯ) в обеих сублиниях. В современных исследованиях микроядерный тест применяется не только для оценки генотоксичности факторов среды, но и для прогноза канцерогенеза [8]. В нашей работе в совокупности с методом ДНК-комет и другими подходами он давал представление о процессе становления цитогенетических на-

рушений. Фиксация материала для анализа проводилась через 16 и 24 ч культивирования клеток после облучения. Результаты представлены на рис. 2 и в табл. 3. В этих экспериментах рассчитан индекс ядерного деления (*NDI*) и учтен процент двуядерных клеток, в которых и произведен подсчет МЯ.

Индекс ядерного деления в облученных клетках *LY-R* практически не изменялся по сравнению с контролем, но уменьшался под влиянием X-лучей в клетках *LY-S* ( $t=7,43$ ;  $P=0.002$ ). Влияние рентгеновского излучения на деление ядер в большей степени проявлялось по частоте двуядерных клеток, которая снижалась в сублинии *LY-S* более чем в 3 раза по сравнению с необлученными клетками и почти в 4 раза по сравнению с облученными клетками *LY-R*. Указанные различия высоко достоверны ( $t=5,99$ ;  $P=0.009$  и  $t=7.44$ ,  $P=0.006$ , соответственно). Эти же тенденции подтвердились при фиксации материала на 24 ч культивирования клеток с той разницей, что частота двуядерных клеток *LY-S* после их облучения оказалась выше (35% по сравнению с 19%).

В табл. 3 представлены частоты цитогенетических повреждений в зависимости от срока фиксации.

Таблица 3. Влияние X-лучей на частоту микроядер в клетках *LY-R* и *LY-S*

Вариант опыта	Сублиния <i>LY-R</i>			Сублиния <i>LY-S</i>		
	Количество клеток	Частота МЯ, ‰	$\chi^2$	Количество клеток	Частота МЯ, ‰	$\chi^2$
Фиксация на 16 ч культивирования						
Контроль	4000	3,5		3000	3,0	–
X-лучи	5000	36,0	111.3*	4000	11,0	15.24*
Фиксация на 24 ч культивирования						
Контроль	5000	8,5		4000	14,7	11.90 <sup>#</sup> ;
X-лучи	6000	27,2	63.78*	5000	40,8	76.13*;17,01 <sup>#</sup>

Примечание. \* Достоверные различия между вариантами контроля и облучения внутри сублиний при  $P<0.01$ ;

<sup>#</sup> Достоверные различия между линиями *LY-R* и *LY-S* при  $P<0.01$ .

При микроядерном анализе на 16 ч культивирования клеток, стимулированных к делению, частота спонтанного возникновения микроядер не превышала 3,5‰, а уровень индуцированных МЯ в клетках *LY-R* оказался даже больше, чем в клетках *LY-S*. Ситуация изменилась при фиксации материала через 24 ч, когда и спонтанная, и индуцированная частота МЯ в сублинии *LY-S* превышала этот показатель в сублинии *LY-R* в 1,7 и 1,5 раза соответственно. Следовательно, через 24 ч сублиния *LY-S* отвечала на ионизирующее излучение существенно большей частотой цитогенетических нарушений, а несовпадение результатов в разные сроки фиксации может объясняться неодинаковой скоростью клеточной пролиферации, в результате чего накопление клеток с МЯ в сублинии *LY-S* запаздывало по отношению к сублинии *LY-R*. По-видимому, на это же указывает динамика частоты двуядерных клеток в этой сублинии. Данные показывают, что трансформация первичных повреждений ДНК в фиксированные мутации является сложным процессом, зависящим от эффективности репарации ДНК и пролиферативной активности клеток.

**Заключение.** Таким образом, выявлены существенные различия между сублиниями лимфомы мыши *LY-R* и *LY-S* по следующим параметрам: 1) рентгеновское излучение снижало выживаемость клеток в сублинии *LY-S* в два раза по сравнению с сублинией *LY-R*; 2) частота эндогенных (в отличие от экзогенных) повреждений ДНК была выше, а скорость и эффективность репарации ДНК – ниже в сублинии *LY-S* по сравнению с сублинией *LY-R*; 3) рентгеновское излучение значительно подавляло пролиферативную активность клеток *LY-S*; 4) частота спонтанных и индуцированных облучением МЯ в сублинии *LY-S* достоверно превышала этот показатель в сублинии *LY-R* на 24 ч культивирования клеток. Представленные результаты свидетельствуют в пользу более высокой радиочувствительности сублинии *LY-S*, что согласуется с ранее опубликованными данными [4, 5] и подтверждает наличие в ней дефекта репарации двунитевых разрывов ДНК. Это позволит использовать указанные линии клеток млекопитающих в качестве модели для выявления радиопротекторов и изучения механизмов их действия, обусловленных стимуляцией процесса воссоединения двунитевых разрывов ДНК, и/или влиянием на сигнальные молекулы, регулирующие клеточный ответ на индукцию повреждений ДНК такого типа.

Данное исследование выполнено при поддержке БРФФИ (договор Б07МС-017 от 1 апреля 2007 г.).