

Научные труды «Молекулярная и прикладная генетика».
Минск. – Том 2. – 2006. – С. 20-26.

**ВЛИЯНИЕ АНТИМУТАГЕНА ДИГИДРОПИРИДИНОВОГО РЯДА НА
ВЫЖИВАЕМОСТЬ КЛЕТОК И ЧАСТОТУ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В
СУБЛИНИЯХ L5178Y ЛИМФОМЫ МЫШЕЙ**

Даливеля О.В.¹, Савина Н.В.¹, Кужир Т.Д.¹.
Iwona Buraczewska², Maria Wojewodzka², Irena Szumiel²

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Академическая, 27

E-mail: O.Dalivelya@igc.bas-net.by

²Institute of Nuclear Chemistry and Technology,

Dorodna 16, PL-03-195 Warsaw, Poland, e-mail: izasz@orange.ichtj.waw.pl

Ключевые слова: антимуутагены, производные 1,4-дигидропиридина, репарация ДНК, поли-ADP-рибозилирование, сублинии лимфомы мышей.

Введение. Современные методы профилактики и эффективного лечения различных, в том числе злокачественных, заболеваний должны базироваться на изучении молекулярных мишеней, играющих важную роль в их этиологии и патогенезе. В некоторых случаях нарушения, происходящие на молекулярном уровне, инициируют патологические процессы, в других – сопутствуют или осложняют их. Известна роль повреждений ДНК и нарушений репарации ДНК в канцерогенезе и другой патологии, поэтому большое внимание уделяется скринингу и изучению антимуутагенов. На современном этапе антимуутагены рассматриваются как ингибиторы мутагенеза и канцерогенеза в окружающей среде [1], средства, улучшающие качество жизни [2], индукторы защитных систем [3, 4], модуляторы молекулярных процессов и генов, ответственных за клеточный ответ на генотоксичный и другие виды стресса. Подробный обзор данной литературы, касающихся молекулярных механизмов действия антимуутагенов/антиканцерогенов, опубликован в 2005 г. [5]. Он свидетельствует о целесообразности использования антимуутагенов как средств профилактики и оптимизации лечения рака и многих хронических заболеваний.

Ранее нами в опытах на дрозофиле и мышах показано, что некоторые производные 1,4-дигидропиридина (1,4-ДГП) являются эффективными антимуутагенами и защищают соматические и половые клетки животных от химических мутагенов [6, 7]. Выявленные закономерности подавления спонтанного и химического мутагенеза

позволили предполагать множественные механизмы действия этих препаратов, в частности, как за счет антиоксидантной активности, так и влияния на различные защитные системы организма. С помощью стандартных подходов, а именно, учитывая эффект материнской репарации и различную репарационную способность пре- и пост-мейотических стадий сперматогенеза, показано, что наиболее эффективные антимутагены ДГП и глутапирон могут модулировать репарацию ДНК, приводя к снижению частоты ЭМС-индуцированных разрывов хромосом и точковых мутаций [8]. Высказано предположение, что одним из механизмов влияния производных 1,4-ДГП на репарацию может быть их вмешательство в NAD (NADP)-зависимые энергетические процессы и ADP-рибозилирование [9]. Известно, что семейство поли-(ADP-рибозо)полимераз (PARP) осуществляет посттрансляционную модификацию ДНК, инициирует репарационные процессы и клеточный ответ на все виды стресса, обеспечивает целостность генома, участвует в формировании приспособленности индивидуума к окружающей среде [10–12]. Кроме того, PARP и PARG (поли-(ADP-рибозо)гликозилаза) рассматриваются как новые мишени терапевтического воздействия не только при канцерогенезе, но и при ишемической болезни, диабете и других заболеваниях с нарушенным метаболизмом поли-ADP-рибозы [13]. Поэтому выявление веществ, способных изменять метаболизм этого полимера, создает предпосылки для развития нового направления в терапии многих заболеваний.

Целью данного исследования является тестирование одного из производных 1,4-ДГП *in vitro* с использованием клеточных сублиний лимфомы мышей L5178Y (LY-R) и L5178Y-S (LY-S), различающихся как по чувствительности к радиации, так и по содержанию и метаболизму поли-ADP-рибозы [14]. Эта работа проводится совместно с Отделом радиобиологии и охраны здоровья Института ядерной химии и технологии (Варшава, Польша).

Материалы и методы

Использовали две сублинии лимфомы мышей L5178Y (LY), различающиеся по чувствительности к рентгеновским лучам: LY-R (радиорезистентная) и LY-S (радиочувствительная) [14]. Клетки культивировались в среде Фишера с добавлением 10% инактивированной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO₂. Для оценки выживаемости использовали суспензии с плотностью клеток 25×10³/мл (для вариантов без облучения) и 100×10³/мл (для вариантов с облучением). Плотность клеточной суспензии для проведения нейтрального гель-электрофореза одиночных клеток (Comet-assay) была не менее 400×10³/мл.

Обработка клеток. Клетки облучали с помощью исследовательской кобальтовой пушки при комнатной температуре. При изучении выживаемости клеток использовали эквивалентные по токсичности дозы облучения – 1 Gy для линии LY-S и 2 Gy для линии LY-R. При оценке повреждений ДНК для обеих линий применялась одинаковая

доза облучения – 10 Gy. В качестве модификатора исследовали одно из производных 1,4-дигидропиридина (ДГП), которое добавляли в среду культивирования клеток. Облучение клеток происходило в присутствии либо в отсутствии антимутагена; отмывка препарата после облучения не проводилась.

Оценка выживаемости клеток проведена с использованием стандартного метода окраски трипановым синим. Контрольные и обработанные антимутагеном 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 [15]. Клеточные суспензии (опытные и контрольные) были смешаны с равным объемом низкоплавкой агарозы. 100 мкл полученной смеси наносили на предметное стекло с заранее наложенной 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 были трижды отмыты 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 трижды промывали нейтрализующим раствором (0,4 M Tris, pH 7,5), высушивали и окрашивали 1 μM DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride). На каждом из 2-х стекол выбирали 50 комет, которые анализировали при увеличении 200× на эпифлуоресцентном микроскопе (Labophot-2, Nikon). Компьютерный анализ препаратов проведен с помощью программы Comet v.3.1 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). В качестве основного показателя при оценке повреждений ДНК использовали «момент хвоста» (*tail moment*), вычисленный из длины хвоста, умноженной на процент ДНК в хвосте.

Результаты представляют средние значения трех повторностей, статистическая обработка данных проводилась с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel-2000.

Результаты и обсуждение

Первым этапом работы было изучение влияния препарата ДГП в дозе 100 μM на выживаемость клеток линий LY-R и LY-S. Эти результаты представлены в таблице 1.

Сравнение сублиний по этому показателю подтверждает, что сублиния LY-S чувствительна к действию ионизирующей радиации, т.к. меньшая доза (1 Гр) вызывала гибель клеток, в 2 раза превышающую частоту мертвых клеток у линии LY-R. Изученная концентрация ДГП не оказала цитотоксического эффекта. У резистентной линии ДГП был нейтрален по отношению к спонтанной выживаемости клеток и примерно на 20% уменьшал цитотоксический эффект радиации. У чувствительной линии ДГП повышал спонтанную выживаемость клеток и подавлял токсическое действие радиации на 40%. Описанные закономерности хорошо видны на рисунке 1, который отражает защитный эффект ДГП по сравнению с уровнем спонтанной гибели клеток либо токсическим действием радиации.

Таблица 1

Влияние антимутагена дигидропиридинового ряда на выживаемость клеток двух сублиний лимфомы мышей

| Вариант | Линия LY-R | | | Линия LY-S | | |
|------------------------|-------------------|------------------------|------------|-------------------|------------------------|---------------|
| | Количество клеток | Частота мертвых клеток | t; P | Количество клеток | Частота мертвых клеток | t; P |
| Спонтанный контроль | 2578 | 2,13±0.20 | | 5470 | 1,13±0.13 | 4.17;<0.001 |
| ДГП 10 ⁻⁴ М | 1683 | 1,66±0.24 | 1.52;>0.05 | 2622 | 0,61±0.20 | 2.17;<0.05 |
| 2 Гр/1 Гр | 2568 | 5,30±0.19 | 100 | 5154 | 10,75±0.13 | 23.70;<0.0001 |
| ДГП 10 ⁻⁴ М | 3939 | 4,72±0.16 | 2;<0.05 | 5818 | 6,58±0.13 | 23.17;<0.0001 |

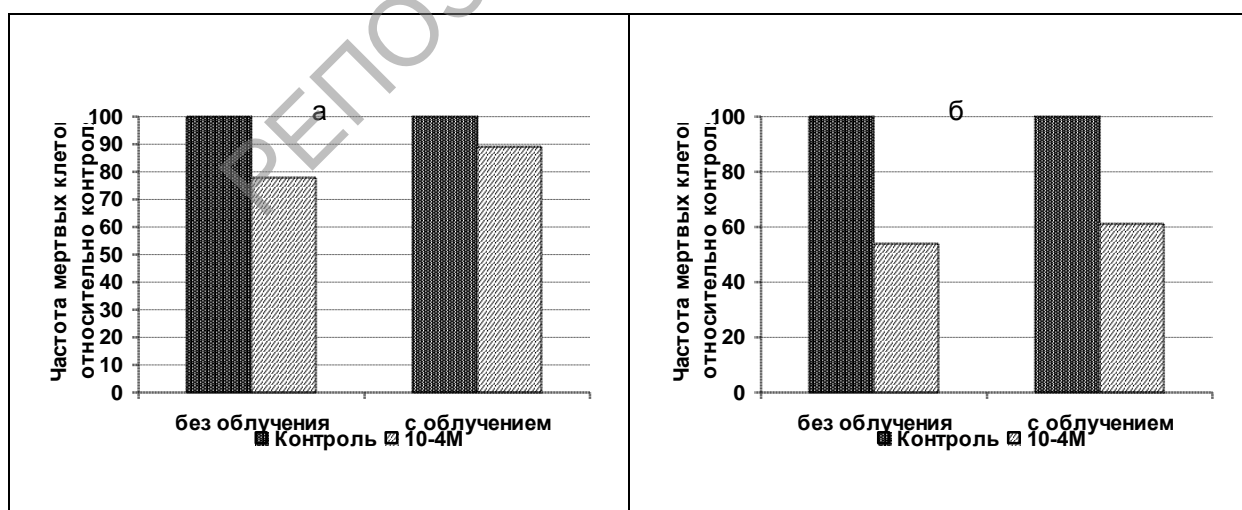


Рис. 1. Влияние ДГП на частоту мертвых клеток в сублиниях LY-R (а) и LY-S (б) по отношению к спонтанному либо индуцированному уровню клеточной гибели, принятому за 100%

Изучено влияние этого антимутагена в той же дозе на частоту двунитевых разрывов ДНК, оцененных методом нейтрального гель-электрофореза единичных клеток. Частоту повреждений ДНК в виде комет учитывали на 0, 15, 60 и 120 мин после облучения; спонтанный уровень повреждений контролировали в начале и конце исследования. Полученные данные представлены в таблице 2. Видно, что спонтанная частота повреждений ДНК увеличена у чувствительной сублинии. Сразу после облучения этот показатель выше у резистентной сублинии, однако уже через 15 мин частота повреждений ДНК достигает одинакового уровня у обеих линий, а через 120 мин у резистентной сублинии она меньше, чем у чувствительной. Более низкая стартовая частота повреждений ДНК у сублинии LY-S может быть обусловлена пониженной выживаемостью клеток (таблица 1). В целом данные, отражающие эффект ионизирующей радиации, показывают, что процесс репарации у линии LY-S замедлен по сравнению с линией LY-R, об этом же свидетельствует график на рисунке 2, который отражает кинетику воссоединения двойных разрывов ДНК.

Таблица 2

Влияние облучения и антимутагена дигидропиридинового ряда на частоту повреждений ДНК, оцененных методом ДНК-комет

| Вариант | Линия LY-R | | | Линия LY-S | |
|------------------------|--------------------|-------------------------|-------------|-------------------------|---------------|
| | Время анализа, мин | Момент хвоста, усл. ед. | t; P | Момент хвоста, усл. ед. | t; P |
| Спонтанный контроль | 0 | 8,05±0,32 | | 12,01±0,63 | 5,58; <0,0001 |
| | 120 | 9,18±0,46 | | 10,21±0,39 | |
| Σ контроль | 0-120 | 8,73±0,1 | | 11,11±0,37 | 4,96; <0,0001 |
| 10 Гр | 0 | 36,77±1,46 | | 29,82±1,49 | 3,34; 0,001 |
| ДГП 10 ⁻⁴ М | 0 | 31,29±1,34 | 2,77; 0,006 | 34,0±1,60 | 2,34; 0,02 |
| 10 Гр | 15 | 19,20±0,85 | | 19,70±0,99 | |
| ДГП 10 ⁻⁴ М | 15 | 16,83±0,87 | 1,96; 0,05 | 14,20±0,93 | 4,06; <0,0001 |
| 10 Гр | 60 | 13,58±0,74 | | 13,95±0,82 | |
| ДГП 10 ⁻⁴ М | 60 | 11,94±0,55 | 1,77; >0,05 | 15,11±0,88 | 0,96; >0,05 |
| 10 Гр | 120 | 9,25±0,35 | | 11,02±0,52 | |
| ДГП 10 ⁻⁴ М | 120 | 9,25±0,35 | <0,1; >0,05 | 11,08±0,68 | <0,1; >0,05 |

Согласно данным таблицы 2 ДГП в дозе 100 мкМ проявляет защитный эффект против повреждающего действия радиации у резистентной сублинии. Различия высоко достоверны на первых 15 минутах инкубации клеток. В отличие от этого, ДГП

сенсibiliзирует действие радиации на 0 минуте и снижает его эффект на 15 минуте инкубации клеток чувствительной сублинии.

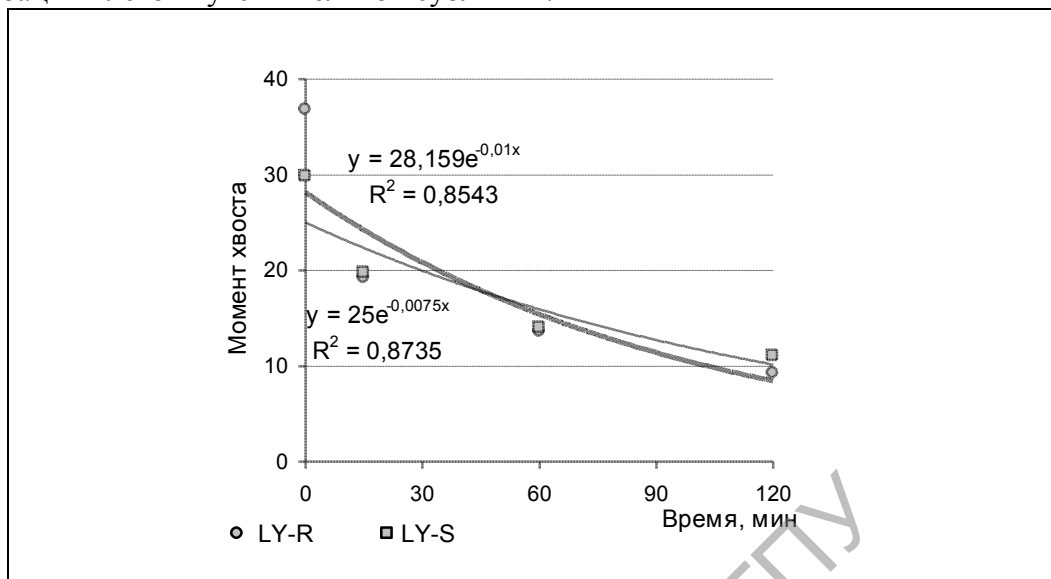


Рис. 2, Скорость репарации ДНК в облученных клетках LY-R и LY-S

Рисунок 3 показывает изменения частоты повреждений ДНК под влиянием антимутагена относительно 100% уровня, индуцированного X-лучами.

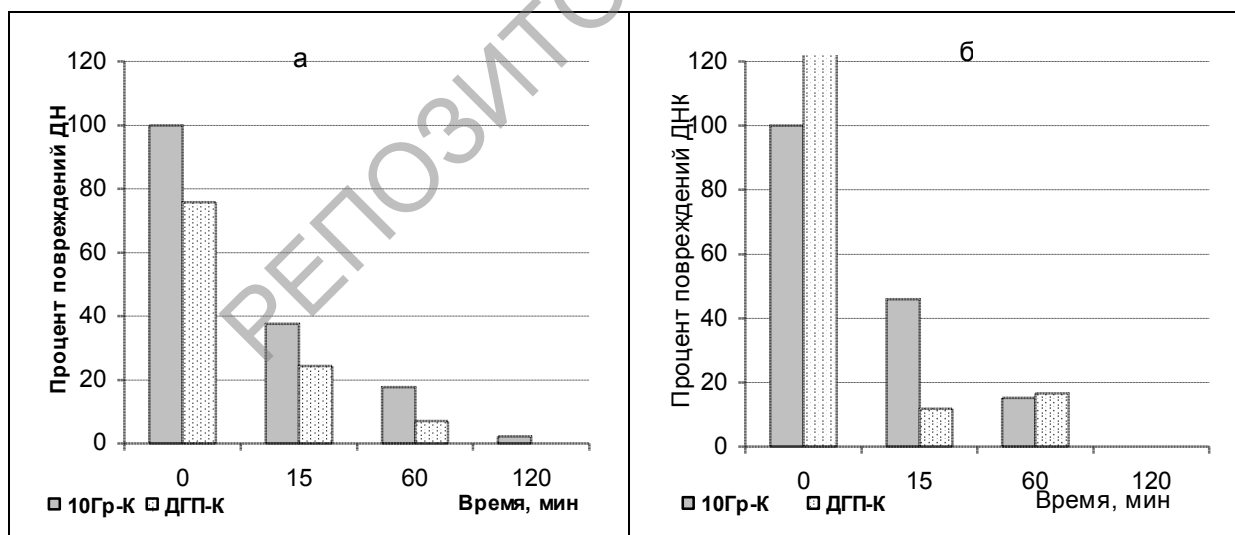


Рис. 3. Снижение частоты ДНК повреждений у сублиний LY-R (а) и LY-S (б) относительно уровня, индуцированного радиацией

10 Гр – уровень ДНК повреждений, индуцированных радиацией; К – спонтанный (фоновый) контроль, ДГП = 100μМ.

Видно, что ДГП при концентрации 100 μМ проявляет стабильный защитный эффект у радиорезистентной сублинии. Под влиянием ДГП уровень индуцированных

повреждений за первые 15 мин снижается примерно на четверть, а через час – более чем наполовину. Анализ данных, полученных на линии LY-S, свидетельствует о неоднозначном эффекте ДГП, который повышает частоту радиационно-индуцированных повреждений ДНК на 0 минуте и снижает на 15 минуте. Учитывая метод обработки клеточных культур антимутагеном (т.е, до, после и в момент облучения) нельзя исключить антиоксидантный компонент в механизме его действия против радиации. Однако одна и та же доза в идентичных условиях снижала эффект радиации сразу после облучения у сублинии LY-R и существенно усиливала у сублинии LY-S.

Таким образом, при изучении выживаемости облученных клеток подтверждена повышенная чувствительность сублинии LY-S к ионизирующей радиации. Показано также, что репарация радиационно-индуцированных повреждений ДНК в сублинии LY-S замедлена по сравнению с сублинией LY-R. Антимутаген дигидропиридинового ряда в концентрации 100 μM не влиял на спонтанную выживаемость и незначительно повышал выживаемость облученных клеток радиорезистентной сублинии. Инкубация в присутствии антимутагена существенно (на 40%) снижала гибель как облученных, так и необлученных клеток сублинии LY-S.

С помощью метода ДНК-комет показано, что антимутаген дигидропиридинового ряда в дозе 100 μM проявляет защитное действие против радиации в клетках резистентной сублинии, тогда как его эффект по отношению к этому фактору в клетках чувствительной сублинии неоднозначен. По-видимому, защитные эффекты ДГП относительно выживаемости клеток и повреждений ДНК, обусловлены разными механизмами. Отсутствие явного защитного эффекта ДГП против индуцированных радиацией двойных разрывов ДНК в клетках LY-S может быть обусловлено дефектами соответствующей системы репарации [14]. Результаты о влиянии ДГП на процесс репарации ДНК в радиорезистентной сублинии лимфомы мышей соответствуют данным, полученным на лимфоцитах и лимфобластоидных клетках человека с помощью щелочного гель-электрофореза единичных клеток, позволяющего учесть одиночные разрывы ДНК и ряд других повреждений, индуцированных ионизирующей радиацией, алкилирующим агентом и перекисью водорода [16]. И те, и другие данные *in vitro* подтверждают репарогенные свойства данного антимутагена, выявленные ранее в опытах на дрозофиле. Различия в эффектах ДГП на сублиниях LY-S и LY-R могут свидетельствовать также о влиянии антимутагена на метаболизм поли-ADP-рибозы, однако этот механизм требует дальнейшего детального изучения.

Литература

1. De Flora S., Ramel C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview // *Mutat. Res.*, – 1988. – Vol.202, №2. – P. 285–306.
2. De Flora S. Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis // *Mutat. Res.* – 1988. – Vol. 202. №2, – P. 279–283.
3. Гончарова Р.И. Антимутагенез как генетический процесс // Вестник РАМН, – 1993, – №1, – С.26–33, Гончарова, Кужир, 2005
4. Гончарова Р.И. Теоретические и практические аспекты антимутагенеза // Сборник научных трудов международной научной конференции «Современные проблемы генетики». Минск, 17-18 ноября 2005г. – С. 21-25.
5. Гончарова Р.И., Кужир Т.Д, Молекулярные основы применения антимутагенов в качестве антиканцерогенов // Экологическая генетика, – 2005, – Т.III, №3, С.19–31.
6. Goncharova R.I., Kuzhir T.D, The comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster* // *Mutat.Res.*, 1989, Vol. 214, P, 257–265.
7. Goncharova R., Zabrejko S., Dalivelya O., Kuzhir T., Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse micronucleus test// *Mutat. Res.*, 2001. Vol. 496, P.129–135.
8. Даливеля О.В., Савина Н.В., Кужир Т.Д., Гончарова Р. Модуляция процессов репарации ДНК на примере действия производных 1,4-дигидроизоникотиновой кислоты // Цитология и генетика, – 2005 – Т.39, № 5.– С. 62–72.
9. Кужир Т.Д, Антимутагены и химический мутагенез в системах высших2005 – Т.39, № 5.– С. 62–72. эукариот, – Минск: Тэхналогія, 1999. – 267 с.
10. J. Zhang, Are poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 and deacetylation by Sir2 linked? // *BioEssays* – 2003. – Vol.25, – P.1–7.
11. Oei S.L., Keil C., Zeiger M., Poly(ADP-ribosylation) and genomic stability // *Biochem, Cell Biol*, – 2005. – Vol. 83, – P.263–269.
12. Malanga M., Althaus F.R. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network // *Cell Biol.* – 2005, – Vol. 83. – P.354–364.
13. J, Zhang, J-H, Li, PARP and PARG as novel therapeutic targets // *Drugs of the Future*, – 2002, – Vol. 27, – P.371–383,
14. Szumiel The L5178Y sublines: a summary of 40 year studies in Warsaw // *Raporty IChTJ, Seria B*, – 2005, – №2. – Warszawa, 2005, 46 p.
15. Wojewodzka M., Buraczewska I., Kruszewski M, A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the comet assay with anti-single-stranded DNA antibody // *Mutat. Res.* 2002. – Vol. 518,– P. 9–20.
16. N.I. Pyabokon, R.I. Goncharova, G. Duburs, J. Rzeszowska-Wolny, A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cells in vitro // *Mutat. Res.* – 2005. – Vol..587. – P.52–58.