

КИНЕТИКА РЕПАРАЦИИ ДНК И ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ СВЕРХКОРОТКИМИ ИМПУЛЬСАМИ УСКОРЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ

Р.М. Арутюнян^{1,2}, Г.Г. Оганесян¹, Б.А. Григорян³, Т.А. Арутюнян¹, Н.С. Бабалян^{1,2}

¹Ереванский государственный университет, ²Институт молекулярной биологии НАН РА,

³Институт синхротронных исследований "Кендл", Ереван, Армения,
e-mail: rouben_a@hotmail.com

Резюме. Была исследована активация репарационных путей ДНК (BER, HRR и NHEJ), а также эпигенетические изменения, индуцированные сверхкороткими импульсами ускоренных электронов в клетках человека. При нелетальном, суб-летальном и летальном уровнях повреждений ДНК активизируются все перечисленные пути репарации, однако в зависимости от уровня повреждений изменяется их соотношение. Облучение ускоренными электронами может индуцировать CNV в изученных хромосомных локусах. При суб-летальных и летальных повреждениях происходит метилирование около 40-50% CpG островков в ДНК.

Ключевые слова: облучение, ультракороткие импульсы, ускоренные электроны, репарация ДНК, CNV, эпигенетика, метилирование ДНК

DNA REPAIR KINETICS AND EPIGENETIC CHANGES AFTER IRRADIATION WITH ULTRASHORT PULSES OF ACCELERATED ELECTRONS

R.M. Arutyunyan^{1,2}, G.G. Hovhannisyanyan¹, B.A. Grigoryan³, T.A. Harutyunyan¹, N.S. Babalyan^{1,2}

¹Yerevan State University, ²Institute of Molecular Biology NAS RA, ³"CANDLE" Synchrotron Research Institute, Yerevan, Armenia, e-mail: rouben_a@hotmail.com

Summary. The activation of DNA repair pathways (BER, HRR, and NHEJ), as well as the epigenetic changes, induced by ultrashort pulsed electron beam irradiation were investigated in human cells. All mentioned DNA repair pathways were activated at non-lethal, sub-lethal and lethal levels of DNA damages. However, the relative level of certain pathway activation depends on the level of DNA damage. Electron beam irradiation may induce CNVs in studied chromosome loci. The sub-lethal and lethal levels of DNA damages caused increase in CpG islands methylation by 40-50%.

Key words: irradiation, ultrashort pulses, accelerated electrons, DNA repair, CNV, epigenetics, DNA methylation.

Ускоренные электроны являются одним из основных источников ионизирующей радиации, используемой в настоящее время при лучевой терапии опухолей [1]. В последние годы активно развиваются технологии для создания лазерно-плазменных ускорителей, которые способны генерировать фемто- и пикосекундные импульсные электронные пучки сверхвысокой энергии (Тев). Результаты исследований показали, что увеличение энергии электронов для достижения высокой мощности дозы при низкочастотных импульсах не влияет на радиобиологическую эффективность в условиях *in vitro* и *in vivo* [2, 3]. Однако, ранее была выдвинута теория, что на радиобиологическую эффективность может повлиять именно фемто- и пикосекундное импульсное электронное облучение, вне зависимости от мощности дозы [4], которое, в свою очередь, можно получить с использованием лазер-генерируемых линейных ускорителей электронов с высоким уровнем стабильности и воспроизводимости параметров пучка. Существуют единичные публикации о биологических эффектах ультракоротких импульсов электронных пучков [5, 6], которые основаны на

16

предположении, что, поскольку длительность облучения сверхкороткими импульсами электронов намного короче длительности биологических процессов в облученных клетках, можно ожидать возникновения новых/иных радиационных эффектов. Таким образом, возникла необходимость в детальном изучении радиобиологических эффектов ультракоротких электронных пучков с целью будущего применения импульсного облучения в терапии злокачественных новообразований.

Цель исследования: Изучение активации репарационных путей (BER-эксцизионная репарация оснований; HRR-репарация гомологичная рекомбинация; NHEJ-негомологичное соединение концов) при различных уровнях повреждений ДНК, анализ молекулярно-цитогенетических эффектов ускоренных электронов, а также эпигенетические изменения, индуцированные сверхкороткими импульсами ускоренных электронов в клетках человека.

Материалы и методы: В качестве источника облучения использовали линейный ускоритель с лазерным фотокатодом АРЕАЛ (CANDLE, Армения) [7]. Клетки облучали в дозах 0,1; 1; 8 Гр при 3,6 Гр/мин мощности дозы. Дозы облучения предварительно были выбраны на основе метода формирования колоний (выживаемость клеток), которые в дальнейшем рассматривались как дозы приводящие к нелетальным (>90% выживаемость, 0,1 Гр), суб-летальным (50% выживаемость, 1 Гр) и летальным (<10% выживаемость, 8 Гр) повреждениям. Для индукции CNV клетки облучали в дозах 0,5; 1,5 и 3 Гр при 2Гр/мин мощности дозы. В исследованиях использовали клеточную линию MRC-5 (фибробласты человека) и лимфоциты периферической крови. Клетки культивировали в стандартных условиях CO₂-инкубатора (5 % CO₂, 37°C) с использованием сред и сывороток рекомендованных АТСС. Активацию репарационных путей BER, HRR и NHEJ определяли колориметрическим методом с использованием ELISA Kits (CytoGlow™) в соответствии с рекомендациями производителя. CNV анализировали методом *pod*-FISH. Уровень метилирования ДНК определяли с использованием EpiJET DNA Methylation Analysis Kit (MspI/HpaII) (Thermo Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя. Образование двунижевых разрывов (ДР) ДНК и механизмы репарации ДНК были исследованы с помощью иммуноцитохимического окрашивания клеток с использованием антител, специфичных к фосфорилированному гистону H2AX, а также к каталитической субединице ядерной ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK). В качестве референтного облучения использовали рентгеновское излучение (RUM-17, Россия; 150 кВ, 10 мА, 0,5 мм Cu и 1 мм Al фильтры, 0,24 Гр/мин).

Результаты и обсуждение: Было показано, что при нелетальном, суб-летальном и летальном уровнях повреждений ДНК активизируются все перечисленные пути репарации, однако в зависимости от уровня повреждений изменяется их соотношение. В частности, при нелетальных повреждениях более выражена экспрессия белка MRE11, который ответственен за активацию пути HRR, при суб-летальных повреждениях наблюдается более высокий уровень APEX1/BER/ и DNA-PK/NHEJ/ белков, а при летальных повреждениях NHEJ является основным путем репарации. Анализ кинетики активации репарационных путей показал, что вне зависимости от уровня повреждений, максимальная активация репарационных путей наблюдается спустя 30 мин после облучения, а через 4 ч после облучения уровень активности перечисленных путей активации достигает контрольного, что свидетельствует о завершении репарационных процессов, вызванных облучением. Сравнительный анализ сверхкороткого импульсного электронного облучения с референтным рентгеновским облучением показал, что выход ДР ДНК (фокусы γH2AX) на единицу дозы импульсного или рентгеновского излучения схож и равен 26±2 фокусов/клетка/Гр и 30±2

17

фокусов/клетка/Гр, соответственно. Однако, ДР ДНК, индуцированные импульсным излучением, элиминируются более медленно по сравнению с ДР, индуцированными рентгеновским излучением, что свидетельствует об образовании более сложных повреждений ДНК при импульсном облучении. DNA-РК при рентгеновском облучении активируется в меньшей степени по сравнению с импульсным. Скорее всего при рентгеновском облучении в процессе фосфорилирования γ H2AX участвует белок ATM. Было показано также, что при суб-летальных и летальных повреждениях происходит метилирование около 40-50% CpG островков в ДНК в сравнении с контролем (клетки без индуцированных повреждений ДНК). В облученных клетках при нелетальном уровне повреждений изменений паттерна метилирования ДНК не наблюдается.

Вариация числа копий ДНК (copy number variation - CNV), возникающие из-за делеций и дупликаций, вносят основной вклад в генетическое разнообразие. Было показано, что de novo CNV могут быть индуцированы малыми дозами ионизирующего излучения. Нами исследовано влияние радиации ускоренных электронных пучков на CNV в хромосомных локусах 1p31.1, 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 лимфоцитов человека после облучения дозами 0,5, 1,5 и 3,0 Гр. Показано, что облучение ускоренными электронами может индуцировать дупликации или амплификации в изученных хромосомных локусах. Поскольку CNV являются стабильными хромосомными перестройками, их учет рекомендуется нами как новый биомаркер генетических эффектов ускоренных электронов.

Выводы: В зависимости от уровня повреждений ДНК при сверхкоротком импульсном электронном облучении, изменяется соотношение активации репарационных путей и имеет выраженную направленность HRR – BER – NHEJ, по мере возрастания уровня повреждений. Максимальная активация репарационных путей наблюдается спустя 30 мин после облучения, а через 4 ч наблюдается завершение репарационных процессов. При суб-летальных и летальных повреждениях, вызванных сверхкоротким импульсным электронным облучением, происходит повышение уровня метилирования ДНК на 40% и 50%, соответственно. Учет CNV рекомендуется как новый биомаркер генетических эффектов ускоренных электронов.

Проведенная работа финансировалась грантами (17А-1F008 и АГ-01/18) Государственного комитета по науке МОН РА.

Список литературы

1. Malka V., Faure J., Glinec Y., Lifschitz A.F. Laser-plasma accelerator: status and perspectives // *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2006. Vol. 364. P. 601–10.
2. Beyreuther E., Karsch L., Laschinsky L. [et al]. Radiobiological response to ultra-short pulsed megavoltage electron beams of ultra-high pulse dose rate // *Int J Radiat Biol.* 2015. Vol. 91. P. 643–652.
3. Oppelt M., Baumann M., Bergmann R. [et al]. Comparison study of in vivo dose response to laser-driven versus conventional electron beam // *Radiat Environ Biophys.* 2015 Vol. 54, № 2). P. 155–66.
4. Andreassi M.G., Borghini A., Pulignani S. [et al]. Radiobiological effectiveness of ultrashort laser-driven electron bunches: micronucleus frequency, telomere shortening and cell viability // *Rad Res.* 2016. Vol. 186. P. 245–253.
5. Acharya S., Bhat N.N., Joseph P., Sanjeev G., Sreedevi B., Narayana Y. Dose rate effect on micronuclei induction in human blood lymphocytes exposed to single pulse and multiple pulses of electrons // *Radiat Environ Biophys.* 2011. Vol. 50. P. 253–263.
6. Khalesh A., Karsch L., Enghardt W. Considerations on the biological effect of laser induced radiation with high dose rates // 2008 IEEE Nuclear Science Symposium Conference

Record. Publisher: IEEE, 19-25 Oct. 2008, Dresden, Germany.

7. Tsakanov V.M., Aroutiounian R.M., Amatuni G.A. [et al]. AREAL low energy electron beam applications in life and materials sciences // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. Section A.* 2016. Vol. 829. P.248-253.