

Биология

УДК 612.014.4.083.36

Г.Г. ОГАНЕСЯН

МЕТОД ДНК-КОМЕТ В ОЦЕНКЕ ПОВРЕЖДЕНИЙ И РЕПАРАЦИИ ДНК
2. СПОНТАННЫЕ И УФ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ГРУППАХ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО РИСКА

Методом ДНК-комет выявлен повышенный уровень индуцированных УФ-облучением повреждений ДНК в клетках больных периодической болезнью и ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС по сравнению с контрольной группой. Обсуждается роль репаративных процессов в наблюдаемых эффектах.

Изучение генотоксических эффектов экзогенных и эндогенных факторов, в том числе и отдаленных генетических последствий радиационного воздействия, является важным аспектом генетического мониторинга и открывает возможности для формирования групп риска в популяциях человека с целью внедрения в дальнейшем возможных мер профилактики.

К группам риска в армянской популяции, для которых характерна повышенная нестабильность генома, относятся, в частности, больные периодической болезнью (ПБ), распространенной преимущественно среди евреев и армян, а также лица, принимавшие участие в ликвидации аварии на Чернобыльской АЭС. Известны данные о повышенном уровне хромосомных aberrаций в лимфоцитах больных ПБ [1] и ликвидаторов из Чернобыля [2].

При мониторинге групп риска изучаются как спонтанные, так и индуцированные мутагенами повреждения ДНК и хромосом. В частности, у ликвидаторов из Чернобыля при облучении клеток *in vitro*, выявлено понижение репарационной активности ДНК [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение уровней спонтанных и УФ-индуцированных повреждений ДНК в лейкоцитах больных ПБ и ликвидаторов Чернобыльской аварии методом ДНК-комет.

Материал и методика. Исследования проводились на образцах крови, собранных у 12 лиц, участвовавших в ликвидации последствий Чернобыльской аварии, облученных дозой, не превышающей 0,25Гр, и 12

здоровых доноров. Кроме этого, изучались также группа из 10 больных ПБ и соответствующая контрольная выборка из 10 здоровых доноров.

Для оценки уровней спонтанных и УФ-индуцированных повреждений ДНК использовалась щелочная модификация метода ДНК-комет, предложенная П. Синхом и соавторами [4] с небольшими модификациями. Клетки крови наносились на предметные стекла после предварительного заключения в агарозный слой и облучались двумя дозами (6 и $12 \text{ Дж}/\text{м}^2$) УФ-С (254 нм) – с использованием бактерицидной лампы. После облучения клетки инкубировались 1 час в питательной среде RPMI 1640 для прохождения эксцизионной репарации. После инкубации лейкоциты помещали в лизирующий раствор (2,5М NaCl, 100мМ ЭДТА, 10мМ трис-буфера с тритоном X-100) для разрушения протеинов и клеточных мембран, затем – в щелочной буфер (300мМ NaOH и 1мМ ЭДТА) для раскручивания цепей ДНК. Электрофорез проводился 25 минут при напряжении 20В и силе тока 300мА. Препараты обрабатывались нейтрализационным буфером и окрашивались бромистым этидием. Кометы анализировались на флюоресцентном микроскопе по методу, предложенному Д. Андерсон и соавторами [5].

Повреждения ДНК выражались в условных единицах (у.е.). Статистический анализ проводился с использованием теста ANOVA из пакета STATGRAPHICS Plus.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о том, что спонтанный уровень повреждений ДНК как в группе больных ПБ (3,0 у.е.), так и в группе ликвидаторов (9,2 у.е.) достоверно не отличается от контрольного (1,2 и 6,2 у.е. соответственно). Однако сравнительный анализ уровней УФ-индуцированных повреждений ДНК позволил выявить повышенную чувствительность лейкоцитов больных ПБ и ликвидаторов к действию обеих доз УФ-облучения.

В клетках больных ПБ уровни повреждений ДНК, индуцированных дозами $6 \text{ Дж}/\text{м}^2$ (165,4 у.е.) и $12 \text{ Дж}/\text{м}^2$ (200,5 у.е.), достоверно отличались от аналогичных показателей в контрольной группе (149,8 и 184,3 у.е.). В обоих случаях $p < 0,001$.

В клетках ликвидаторов УФ-облучение индуцирует 196,1 у.е. (доза $6 \text{ Дж}/\text{м}^2$) и 230,3 у.е. (доза $12 \text{ Дж}/\text{м}^2$) повреждений ДНК, что также достоверно превышает показатели в контрольной группе (175,2 и 200,3 у.е. соответственно), $p < 0,01$.

Известно, что УФ-облучение не является непосредственным индуктором разрывов ДНК. УФ вызывает образование пиримидиновых димеров. Разрывы ДНК выявляются как промежуточные продукты эксцизионной репарации. Неполное воссоединение инцизионных разрывов ДНК может вызывать накопление сайтов незавершенной репарации после повреждения ДНК разными генотоксическими агентами. При этом клетки с измененной активностью воссоединения разрывов ДНК могут легко распознаваться методом ДНК-комет [6].

Известен ряд исследований эффектов УФ-облучения и других генотоксических агентов в клетках пациентов с различными заболеваниями. Пониженная способность воссоединения разрывов ДНК, индуцированных

УФ-облучением [7] и диметилсульфонатом [8], обнаружена в клетках индивидов с иммунодефицитом. При синдроме Блюма показана недостаточность воссоединения фрагментов в процессе репарации после УФ-облучения [6], а также повышенная чувствительность к другим генотоксическим соединениям [9]. Клетки больных атаксией-телеангиэктазией более чувствительны к воздействию соединений, которые повреждают ДНК посредством свободных радикалов кислорода за счет пониженной репарационной активности [10]. Показано, что в лимфоцитах больных псориазом с базальной клеточной карциномой (БКК) образуется больше УФ-индуцированных разрывов ДНК, чем у больных без БКК за счет дефектов репарации [11].

Существуют также работы по изучению повреждений ДНК у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС. При изучении лиц, получивших радиотерапевтическое лечение, и ликвидаторов из Чернобыля показано, что оценка репарации повреждений ДНК *in vitro* может служить биомаркером для популяционного мониторинга при действии радиации *in vivo* [3]. У ликвидаторов Чернобыльской аварии также выявлено, что хроническое облучение может приводить к появлению устойчивых повреждений ДНК [12].

Таким образом, полученные нами результаты о повышенном уровне повреждений ДНК, индуцированных УФ-облучением в лейкоцитах пациентов с ПБ и ликвидаторов из Чернобыля, согласуются с рядом литературных данных и свидетельствуют о том, что действие экзогенных и эндогенных мутагенов *in vivo* может повышать чувствительность клеток к действию генотоксических агентов *in vitro*, не вызывая при этом повышения спонтанного уровня повреждений ДНК. Так как УФ-индуцированные повреждения реализуются опосредованно через репарационные процессы, предполагается, что наблюдаемые эффекты могут быть связаны с понижением активности репарационных систем клетки.

Работа выполнена при поддержке гранта А-301.2 МНТЦ.

Кафедра генетики и цитологии

Поступила 18.06.2002

ЛИТЕРАТУРА

1. Emerit I., Arutyunyan R.M., Sarkisyan T.F., Mejlumian H., Torosian E., Panossian A.G. – Free Radical Biol. Med., 1993, № 15. p. 265–271.
2. Slosina N., Neverova E., Kharchenko T., Nikiforov A. – Mut. Res., 1997, v. 379, p.121–125.
3. Plapert U.G., Stocker B., Fender H., Fliender T.M. – Environ Mol. Mutagen., 1997, v. 30, p. 153–160.
4. Singh N.P., Tice R.R., Stephens R.E., Schneider E.L. – Mutat. Res., 1991, v. 252, p. 289–296.
5. Anderson D., Yu T.-W., Phillips B.J., Schmezer P. – Mutat. Res., 1994, v. 307, p. 261–271.
6. Nocentini S. – Radiation Res., 1995, № 144, p. 170–180.
7. Squires S., Johnson R.T. – Carcinogenesis. 1983, v. 4, p. 565–572.
8. Teo I.A., Broughton B.C., Day R.S., James M.R., Karran P., Mayne L.V., Lehmann A.R. – Carcinogenesis, 1983, v. 4, p. 559–564.

9. Krepinsky A.B., Heddle J.A., German J. – Hum. Genet., 1979, v. 50, p. 151–156.
10. Ward A.J., Olive P.L., Burr A.H., Rosin M.P. – Environmental and Molecular Mutagenesis, 1994, v. 24, № 2, p. 103–111.
11. Moller P., Wallin H., Dybdahl M., Frentz G., Nexø B.A. – Cancer letters, 2000, v. 151, p. 187–192.
12. Plappert U.G., Raddatz K., Roth S., Fliedner T.M. – Stem cells, 1995, 13 (supple 1), p. 215–222.

Գ.Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԴՆԹ-ԳԻՍԱՍՏՂԵՐԻ ՄԵԹՈԴԸ ԴՆԹ-Ի ՎՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԻ ԵՎ ՌԵՊԱՐԱՑԻԱՅԻ ԳՆԱՀԱՏՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

2. ԴՆԹ-Ի ՍՊՈՆՏԱՆ ԵՎ ՌԻՄ-ԻՆԴՈՒԿՑՎԱԾ ՎՆԱՍՎԱԾՔՆԵՐԸ ԳԵՆԵՏԻԿԱԿԱՆ ՌԻՍԿԻ ԽՄԲՈՒՄ

Ամփոփում

ԴՆԹ-ի ՌԻՄ-ինդուկցված վնասվածքների անալիզը թույլ է տալիս որոշել բջիջների համեմատական զգայունությունը տարբեր վնասող գործոնների նկատմամբ: ԴՆԹ-գիսաստղերի մեթոդի կիրառմամբ պարբերական հիվանդությամբ տառապող մարդկանց և Չեռնոբիլի վթարի լիկվիդատորների բջիջներում հայտնաբերվել է ԴՆԹ-ի ՌԻՄ-ինդուկցված վնասվածքների հավաստի տարբերություն առողջ մարդկանց համեմատ: Մինչդեռ ԴՆԹ-ի սպոնտան վնասվածքների մակարդակը երկու խմբերում չէր տարբերվում ստուգիչից: Զննարկվում է ռեպարացիոն պրոցեսների դերը հայտնաբերված էֆեկտներում:

G.G. HOVHANNISYAN

THE COMET ASSAY APPLICATION FOR ESTIMATION OF DNA DAMAGE AND REPAIR

2. SPONTANEOUS AND UV-INDUCED DNA DAMAGE IN GROUPS OF GENETIC RISK

Summary

The analysis of UV-induced DNA damage permits to reveal the comparative sensitivity of cells towards different DNA damaging agents. The comet assay has been used to estimate spontaneous and UV-induced DNA breaks in cells of two groups of genetic risk. In cells of patients with periodic disease and Chernobyl accident clean-up workers the statistically significant increase of UV-induced levels of DNA damage compared with healthy subjects has been revealed. But the level of spontaneous DNA damage in both groups does not differ from the control one. The role of repair processes in revealed effects is discussed.