

Котова Е.В.1, Сергиенко Т.Ф.2,3, Иванова М.А.1, Смольникова В.В.3, Глушен С.В.1, Меркулова И.П.2, Свирновский А.И.3

Влияние цисплатина на репарацию разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека

*1БГУ, 2МГЭУ им
А.Д.Сахарова, 3РНПЦ
гематологии и
трансфузиологии (Минск)*

Одним из механизмов формирования устойчивости клеток к повреждающим воздействиям является активация систем репарации ДНК. В частности, в лимфоцитах человека возможно усиление репарации ДНК путем негомологического слияния концов, что может обеспечивать клеткам устойчивость к ионизирующей радиации *in vitro*. Ингибирование ключевого фермента этого пути репарации – ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) приводит к утрате радиорезистентности (2).

Способностью специфически ингибировать ДНК-ПК обладает также противоопухолевый препарат цисплатин (3). При совместном воздействии на клетки ионизирующей радиации и цисплатина наблюдается синергетический эффект, который обусловлен подавлением репарации ДНК путем негомологического слияния концов (1).

В связи с этим целью работы было сравнительное изучение влияния цисплатина на репарацию разрывов ДНК, вызванных рентгеновским излучением в нормальных и опухолевых лимфоцитах.

Материал и методы

В исследовании было использовано 5 образцов крови больных с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), лечившихся в гематологическом отделении Минской областной клинической больницы, и 4 образца крови здоровых доноров. Лимфоциты периферической крови выделяли на градиенте фиколл-верографина и облучали на установке РУМ-17 (доза 5 Гр). Инкубацию клеток с цисплатином (Pharmacia) проводили в течение 1 часа до облучения (концентрация 5 мкг/мл).

Уровень спонтанного и индуцированного апоптоза через 24 ч культивирования оценивали по морфологии ядер лимфоцитов, окрашенных акридиновым оранжевым. Пролиферативный статус клеток определяли на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson) при окраске иодидом пропидия. Кинетику репарации ДНК и апоптоза исследовали методом comet assay (6) с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager (Zeiss) через 1 и 3 часа после облучения. Подсчитывали около 300 клеток трех типов – без фрагментации ДНК, с частичной и полной (апоптотической) фрагментацией ДНК, а также измеряли длину комет. Статистическую обработку выполняли программой Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Данные предварительного тестирования лимфоцитов на устойчивость к облучению и цисплатину *in vitro* представлены в таблице 1. В качестве референтного использовали уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов, для сравнения приведена также статистическая оценка эффектов у доноров.

Таблица 1

Уровень апоптоза лимфоцитов через 24 часа после рентгеновского облучения и воздействия цисплатина

Образцы лимфоцитов	Количество апоптотических клеток (%), М±м в пробах			
	интактных	в присутствии цисплатина	облученных	облученных в присутствии цисплатина
Лейкемические				
1	9.7 ± 0.3	13.7 ± 1.2**	22.3 ± 1.2**	25.3 ± 0.9**
2	13.3 ± 1.3	14.3 ± 1.7	22.7 ± 0.9**	30.0 ± 1.0**
3	12.0 ± 1.2	20.0 ± 1.0**	16.7 ± 0.9*	19.0 ± 1.5*
4	10.8 ± 1.1	10.0 ± 1.1	9.3 ± 0.5	12.0 ± 0.9
5	6.3 ± 0.2	5.8 ± 0.9	6.3 ± 1.9	6.8 ± 0.5
Нормальные (суммарно)	8,7 ± 0,6	18.1 ± 1.5**	18.1 ± 1.5**	19.8 ± 2.2**

Достоверность отличий от спонтанного апоптоза: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

Образцы лейкемических лимфоцитов 1 и 3 оказались чувствительными ко всем воздействиям, образец 2 – к облучению и его совместному действию с цисплатином. Кросс-резистентностью к цисплатину и радиации обладали образцы 4 и 5. Лимфоциты доноров были чувствительны к цисплатину и ионизирующей радиации.

По данным comet assay для лейкемических лимфоцитов была характерна индивидуальная динамика репарации и апоптоза. Вместе с тем в этих лимфоцитах наблюдались некоторые особенности этих процессов по сравнению с нормальными клетками: более низкий уровень радиационно-индуцированного апоптоза и увеличение количества клеток без повреждений ДНК сразу после облучения.

Для более детального анализа эффектов ионизирующей радиации и цисплатина проанализировано распределение клеток по длине комет. Этот показатель в щелочном comet assay пропорционален суммарному количеству одиночных и двойных разрывов ДНК (6). Поэтому уменьшение длины комет свидетельствует о высокой активности репарационных процессов, тогда как увеличение длины – о преобладании апоптотической фрагментации ДНК. Используя этот подход, мы оценили особенности индивидуальной динамики процесса репарации ДНК в образцах лейкемических лимфоцитов, которые отличались устойчивостью ко всем воздействиям, в сравнении с лимфоцитами, реагирующими на повреждающее воздействие усилением апоптотического процесса.

На рис. 1 представлены распределения чувствительных (образец 1) и устойчивых (образец 4) лимфоцитов по длине комет. Сразу после облучения у чувствительных лимфоцитов (ХЛЛ 1) длина комет распределена

унимодально в соответствии с гауссовой моделью, что свидетельствует о статистически одинаковой реакции клеток на облучение. Устойчивые к облучению лимфоциты (ХЛЛ 4), напротив, отличаются гетерогенностью клеток по длине комет и, следовательно, по соотношению процессов репарации ДНК и апоптоза. В дальнейшем гетерогенность лимфоцитов по степени фрагментации ДНК возрастает, и через 1 час после облучения появляются две четко отделенные друг от друга субпопуляции клеток, одна из которых имеет тенденцию к восстановлению целостности ДНК, тогда как другая уходит на апоптоз.

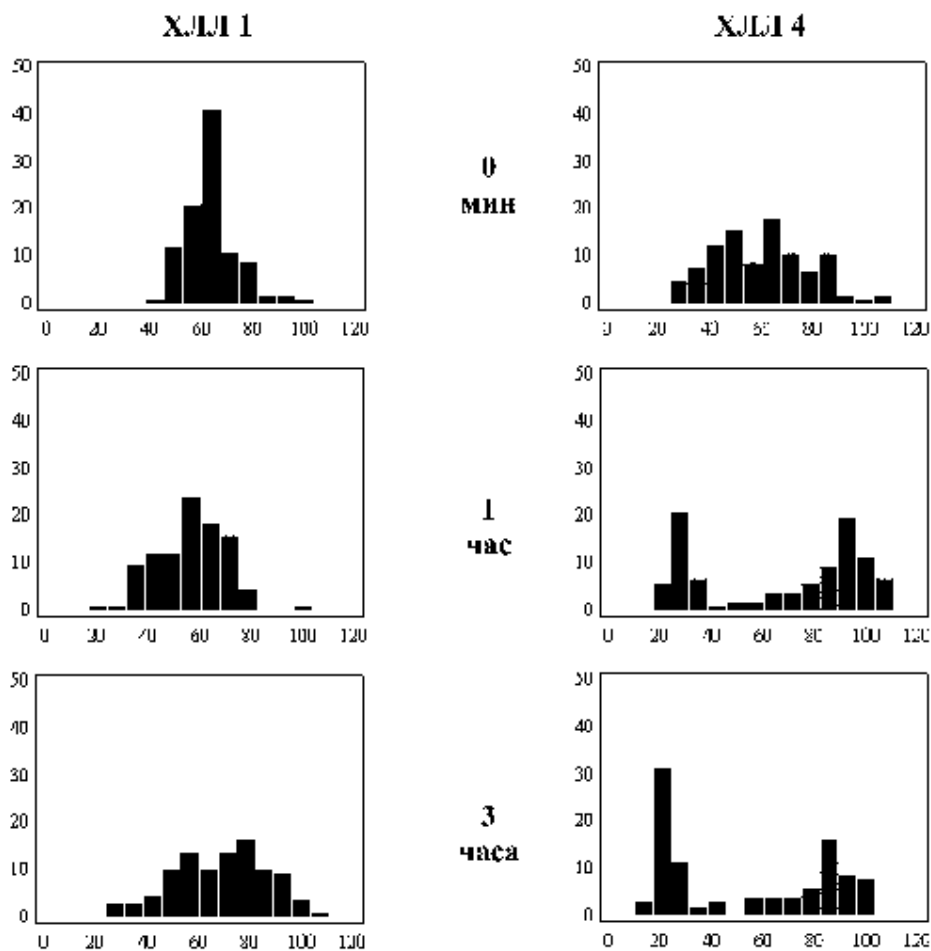


Рис. 1. Распределение лимфоцитов по степени фрагментации ДНК через 1 и 3 часа после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр в образцах 1 и 4. По оси абсцисс указана длина комет (усл.ед.), по оси ординат – их частота (%). Формирование двух субпопуляций клеток с различной степенью фрагментации ДНК наблюдалось также в образце 5 с устойчивостью к ионизирующей радиации (рис. 2, левый ряд гистограмм). Повышенная вероятность восстановления разрывов ДНК клетками субпопуляции с короткими кометами подтверждается отрицательной корреляцией средней длины комет с количеством клеток без видимой фрагментации ДНК ($r = -$

0,658). В субпопуляции клеток с длинными кометами, напротив, в значительной мере индуцируется апоптоз, о чем свидетельствует положительная корреляция средней длины комет с числом апоптотических клеток ($r = 0,607$).

Анализ динамики распределения клеток по длине радиационных комет позволяет также более детально охарактеризовать влияние цисплатина на репарацию ДНК и апоптоз. На рис.2 представлены результаты такого анализа в образце 5.

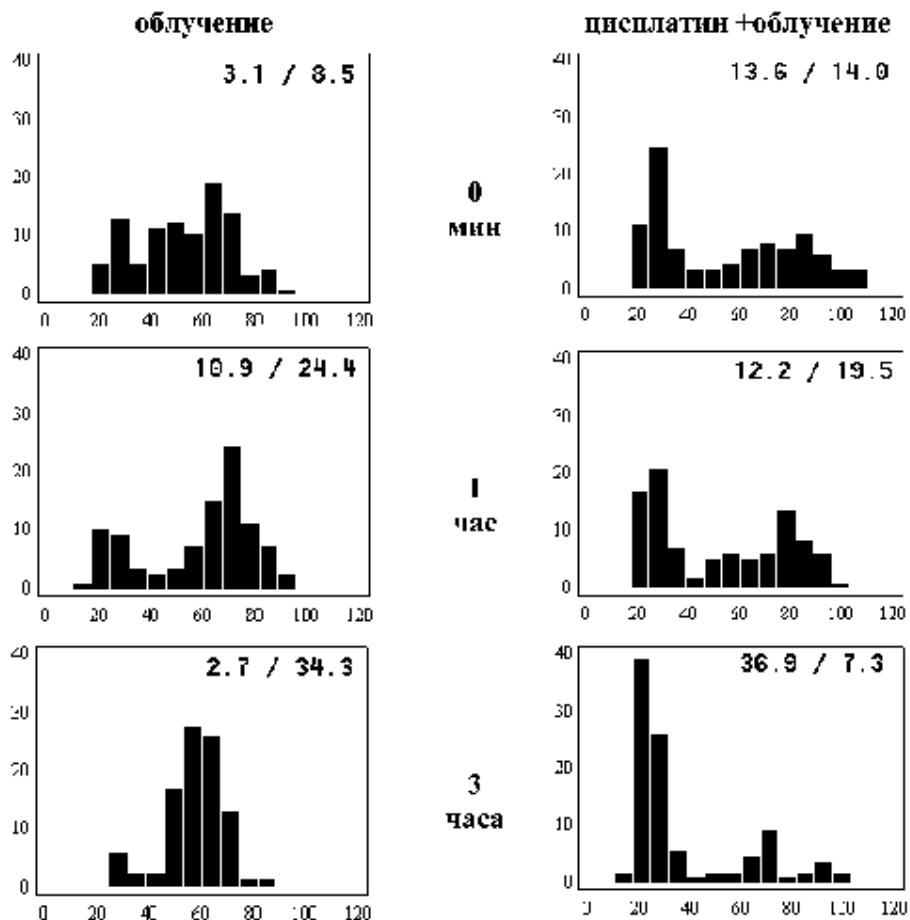


Рис. 2. Влияние цисплатина на распределение клеток по степени фрагментации ДНК через 1 и 3 часа после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр в образце 5. По оси абсцисс указана длина комет (усл.ед.), по оси ординат – их частота (%). В верхнем правом углу гистограмм приведено соотношение клеток без фрагментации ДНК и с апоптотической фрагментацией ДНК (%). Видно, что во все сроки после облучения, цисплатин вызывает увеличение числа клеток с преобладанием репарации ДНК над апоптозом (сдвиг гистограммы влево). Следовательно, цисплатин способствует репарации ДНК, что подтверждается увеличением под его влиянием числа лимфоцитов без видимой фрагментации ДНК (36,9% через 3 часа после облучения), тогда как без цисплатина число подобных клеток в этот срок минимально (2,7%).

Выраженный стимулирующий эффект цисплатина на репарацию разрывов ДНК, индуцированных рентгеновским облучением, наблюдался также в образце 4 (данные не представлены). Поскольку клетки образцов 4 и 5 отличались перекрестной устойчивостью к ионизирующей радиации и цисплатину, можно предположить, что наблюдаемый эффект цисплатина связан с особенностями репарационных систем этих случаев.

У млекопитающих, в том числе и у человека, восстановление разрывов ДНК, вызванных ионизирующей радиацией, осуществляется с помощью двух основных систем репарации. Одна из них использует механизмы гомологической рекомбинации (homologous recombination repair – HRR) и поэтому наиболее активна в пролиферирующих клетках в S-и G2-периодах клеточного цикла, когда доступны матрицы для точного восстановления ДНК. Другая система обеспечивает ускоренное слияние нехомологических концов разрывов (nonhomologous end joining – NHEJ), она максимально активна в G0/G1-периоде клеточного цикла (5).

В исследованных нами образцах анализ пролиферации лимфоцитов с помощью проточной цитометрии показал, что 99% клеток находились в G0/G1-периоде клеточного цикла. Поскольку в непролиферирующих нормальных и лейкоэмических лимфоцитах периферической крови репарация путем гомологической рекомбинации не активна (4), основной системой восстановления разрывов ДНК, вызванных ионизирующей радиацией, по-видимому, является репарация путем нехомологического слияния концов.

При нормально функционирующей системе NHEJ цисплатин, подавляя ДНК-ПК, усиливает повреждающее действие ионизирующей радиации, тогда как при дефектной системе NHEJ этот эффект цисплатина отсутствует (1). Мы также обнаружили, что в образцах лейкоэмических лимфоцитов, устойчивых к химиотерапии, синергетический эффект облучения и цисплатина наблюдается не всегда. Более того, в клетках, которые отличались перекрёстной резистентностью к радиации и цисплатину *in vitro*, цисплатин стимулировал репарацию ДНК. В последнее время кроме основного пути репарации разрывов ДНК (D-NHEJ) обнаружен не зависящий от ДНК-ПК запасной путь (V-NHEJ), который активируется при повреждении или подавлении первого (7). Возможно поэтому, стимулирующий эффект цисплатина объясняется преобладанием в некоторых случаях лекарственной устойчивости таких опухолевых клеток, которые используют запасные пути репарации ДНК.

Выводы

1. Лимфоциты при ХЛЛ гетерогенны по способности восстанавливать разрывы ДНК, индуцируемые ионизирующей радиацией *in vitro*.
2. В лейкоэмических лимфоцитах может наблюдаться эффект стимуляции цисплатином радиационно-индуцированной репарации ДНК.

Литература

1. Boeckman H.J., Trego K.S., Turchi J.J. Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of nonhomologous end joining. //Mol. Can. Res. – 2005.-N3.-P.277-285
2. Deriano L., Guipaud O., Merle-Biral H., Binet J.L., Ricoul M., Potocki-Veronese G., Favaudon V., Maciorowski Z., Muller C., Salles B., Sabatier L., Delic J. Human chronic lymphocytic leukemia B cells can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. //Blood.-2005.-Vol.105, No.12.-P.4776-4783
3. Diggle C.P., Bentley J., Knowles M.A., Kiltie A.E. Inhibition of double-strand break non-homologous end-joining by cisplatin adducts in human cell extracts. //Nucl. Acids Res.-2005.-Vol.33, No.8.-P.2531 – 2539
4. Jones G.G., Reaper P.M., Pettitt A.R., Sherrington P.D. The ATR-p53 pathway is suppressed in noncycling normal and malignant lymphocytes. //Oncogene.-2004.-No.23.-P.1911-1921
5. Rothkamm K., Kruger I., Thompson L.H., Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. //Molec.Cell Biol.-2003.-Vol.23, No.16.-P.5706-5715
6. Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. // Environ.Mol. Mutagenesis.-2000.-No. 35.-P.206-221
7. Wang H., Perrault A.R., Takeda Y., Qin W., Hongyan Wang H., Iliakis G. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. //Nucl. Acids Res.-2003.-Vol. 31, No.18.-P.5377-5388