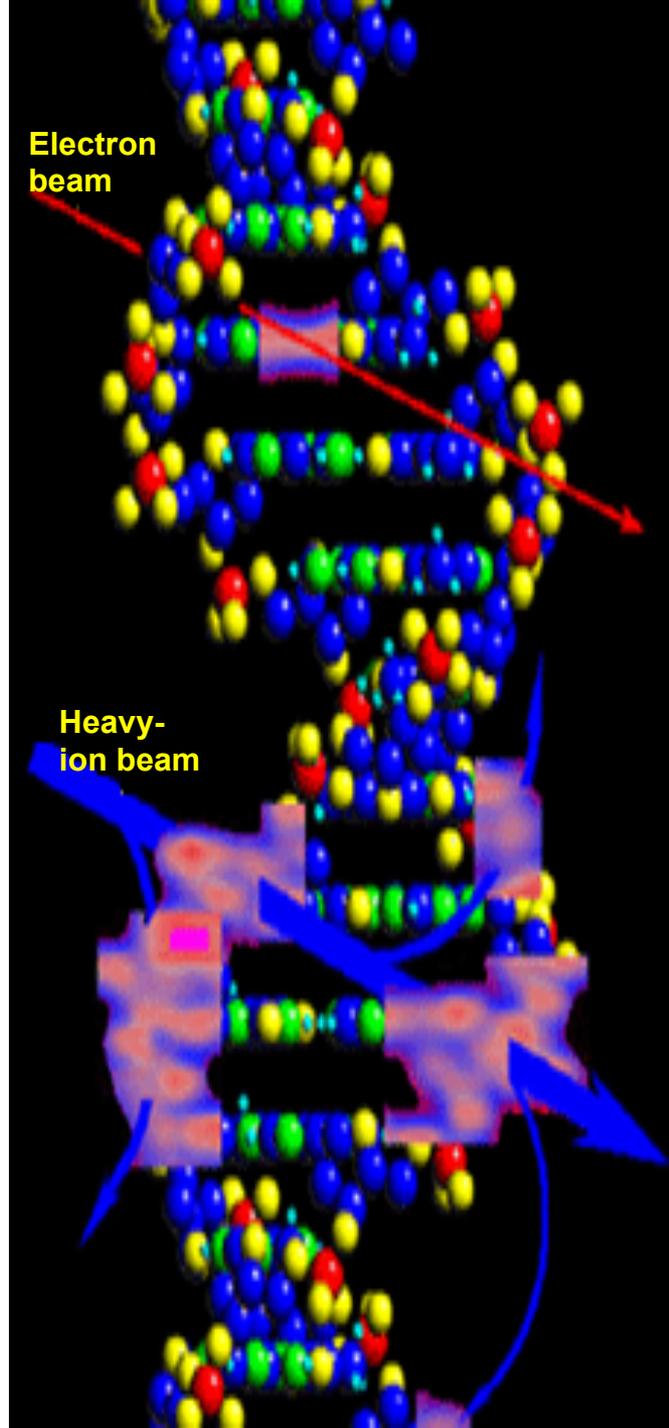


ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ И РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ ОБЛУЧЕНИИ СВЕРХКОРОТКИМИ ИМПУЛЬСАМИ УСКОРЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ

Р.М. Арутюнян, Г.Г. Оганесян,
Б.А. Григорян, Г.В. Цаканова,
С.Г. Арутюнян, Т.А. Арутюнян,
Н.С. Бабаян

Ереванский государственный
университет, Институт молекулярной
биологии НАН РА,
Институт синхротронных исследований
“Кендл”, Ереван, Армения



Облучение ультракороткими электронными импульсами/пучками предоставляет возможность доставлять определенную дозу облучения (0,1-20 Гр) в течение короткого времени.

Длительность облучения ультракороткими импульсами электронов намного короче длительности биологических процессов в облученных клетках, вследствие чего можно предположить возникновение новых радиационных эффектов, которые могут повлиять на радиобиологическую эффективность излучения.

При облучении ультракороткими электронными пучками время облучения настолько мало, что термальные эффекты вызванные передачей энергии также исключаются, что позволяет исследовать чисто радиационное воздействие облучения.

В качестве источника ультракороткого импульсного электронного излучения использовался ускоритель "AREAL" (Институт синхротронных исследований "CANDLE", Армения).



План работы

Источник излучения: AREAL

AREAL:
линейный лазерный ускоритель
электронов
Электронный пучок:
Ультракороткий – 400 fs

Применение
- Потенциальная альтернатива
радиотерапии ускоренными ионами
- Более точный анализ механизмов
повреждений ДНК и клеток

Исследуются:

**Повреждение и
репарация ДНК в
опухолевых и
нормальных клетках
человека**

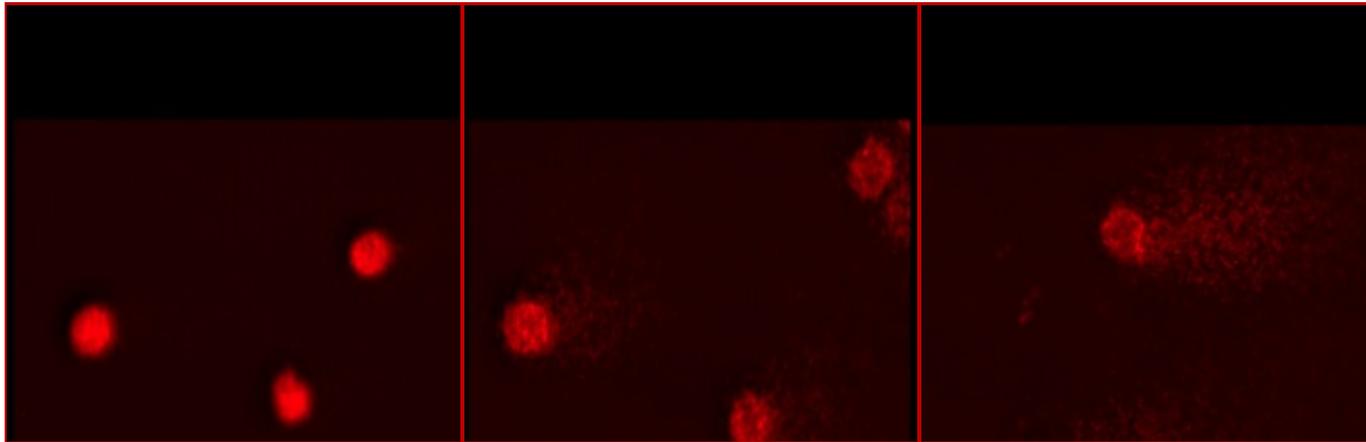
**Молекулярно-
цитогенетические
эффекты в культуре
клеток крови человека**

Параметры излучения

AREAL beam parameters		UV laser parameters	
Beam charge (pC)	30	Wavelength (nm)	258
Electron energy (MeV)	4	Pulse energy	200
Pulse duration (fs)	400	Repetition rate (Hz)	2 /20
Pulse repetition rate (Hz)	2/20	Energy stability	<2%
Beam spot (mm)	15	Beam divergence (mrad)	<0,3
Norm. emittance (mm-mrad)	<0,5	Beam diameter (mm)	4,0
RMS energy spread	<1,5%		
Online dose information	Faraday cup		

На ускорителе “AREAL” нами были проведены биодозиметрические базовые исследования (выживаемость клеток, повреждение ДНК, эффект мощности дозы) ультракороткого импульсного электронного облучения.

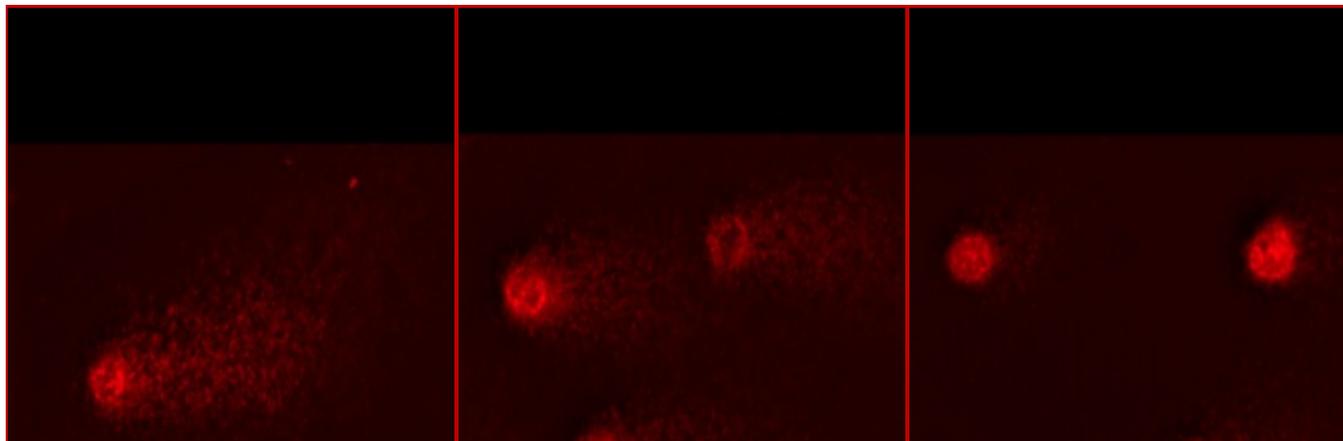
**Индукция комет в клетках К-562 после
облучения на ускорителе AREAL**



Необлученный контроль

Доза облучения 2 Gy

Доза облучения 4 Gy



Доза облучения 8 Gy

Доза облучения 16 Gy

Доза облучения 24 Gy

•

**Анализ повреждений (метод комет) проводили непосредственно после облучения, чтобы исключить эффекты репарации ДНК.
Репарацию ДНК оценивали 24ч после облучения**

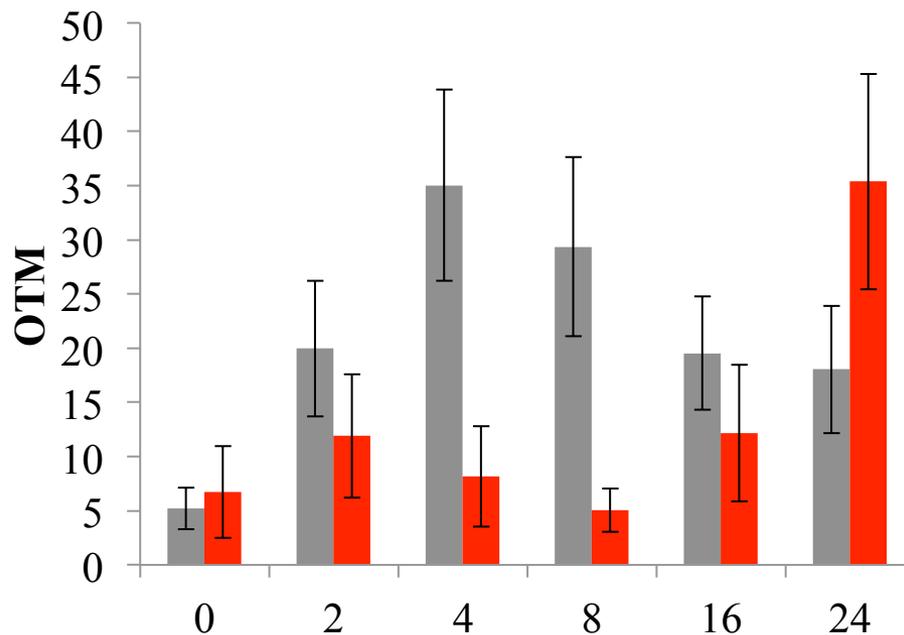
Уровень повреждений ДНК оценивали на основе критерия ОТМ - момента хвоста по методу Olive (или количество ДНК в хвосте кометы умноженное на медиану расстояния миграции)

Начиная с 4 Гр облучения наблюдалось снижение уровня повреждений ДНК. Причина – Клетки с высоким уровнем повреждений ДНК элиминируются, а анализу подвергаются только жизнеспособные клетки.

При облучении дозами 2-16 Гр наблюдалась репарация ДНК в течение 24 ч после облучения.

Показано, что ультрабыстрое электронное облучения приводит к образованию ОН (SSBs) и ДН (DSBs) разрывов ДНК, основная часть которых эффективно репарируется

Повреждение ДНК (Olive Tail Moment) в клетках K562 при 0ч и 24 ч после облучения (частота импульсов 2 Гц)



Низкая мощность дозы – 3,6 Гр/мин (частота импульса 2 Гц),

Уровень повреждений ДНК зависит от дозы облучения

Результаты: повреждение и репарация ДНК

Метод: Comet assay (SSBs, DSBs)

Распределение клеток К-562 на основе уровней повреждений ДНК до и после ультракороткого импульсного электронного облучения *in vitro*

DNA damage

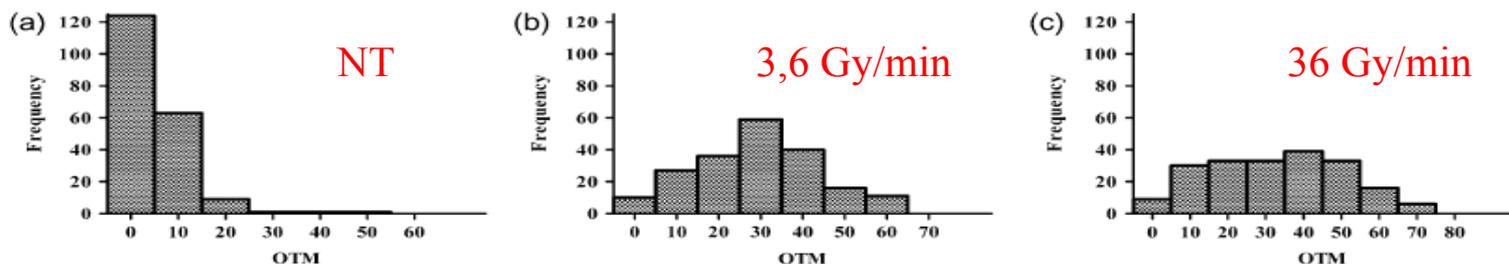


Fig. 1. Probability distribution of the OTM value for unirradiated K-562 cells (a) and those exposed to 8 Gy with the ultrashort electron beam at low (3.6 Gy/min) (b) and high (36 Gy/min) (c) dose rates at the 0 h time point after irradiation.

DNA repair

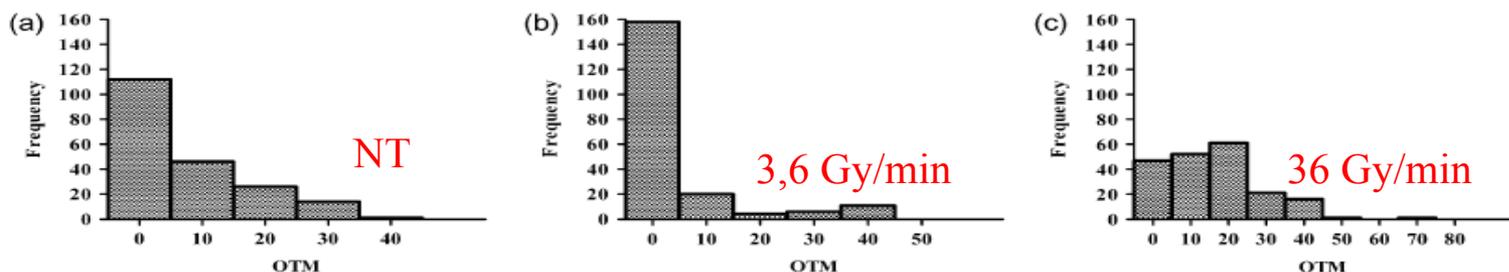


Fig. 2. Probability distribution of the OTM value for unirradiated K-562 cells (a) and those exposed to 8 Gy with the ultrashort electron beam at low (3.6 Gy/min) (b) and high (36 Gy/min) (c) dose rates at the 24 h time point after irradiation.

Анализ распределения начальных повреждений ДНК после облучения высокой мощностью дозы показал сдвиг в сторону увеличения доли повреждений и расширения распределения. Таким образом, увеличение мощности дозы (путем повышения частоты импульсов сверхбыстрых электронов) приводит к увеличению более комплексных повреждений ДНК.

Определение ОБЭ.

Электроны Правена vs. электроны Areal

ОТМ	Praveen et al. Ускоритель Микротрон 8 MeV	Ускоритель Areal 3,6 MeV	ОБЭ	Среднее
	Доза, Гр			
10	1.5	3	2	2.1
20	2.62	5,4	2.1	
25	3.08	7	2.3	

Praveen et al.2014, эксперимент –Облучение проводили с использованием электронного пучка из ускорителя микротрона в университете Мангалор. Это импульсный циркулярный ускоритель (у нас импульсных линейный ускоритель), генерирующий электронный пучок с **максимальным током 50 мА и продолжительностью импульса 2.5 микросекунд** (у нас 400 фемтосекунд) и **энергией электрона 8 МэВ** (у нас 3.6 МэВ)

Результаты: повреждение и репарация ДНК

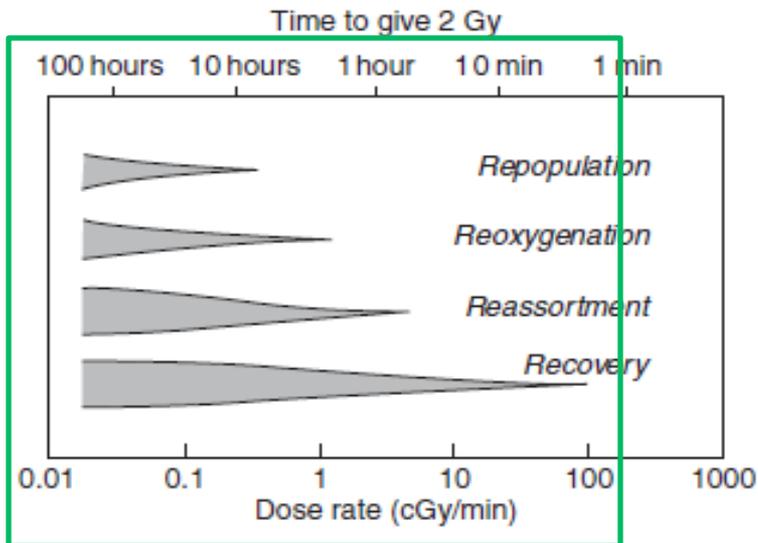
Эффект мощности дозы

Теория 4R (recovery, redistribution, reoxygenation, repopulation)

Восстановление (репарация), перераспределение клеток по циклу, репопуляция и реоксигенация

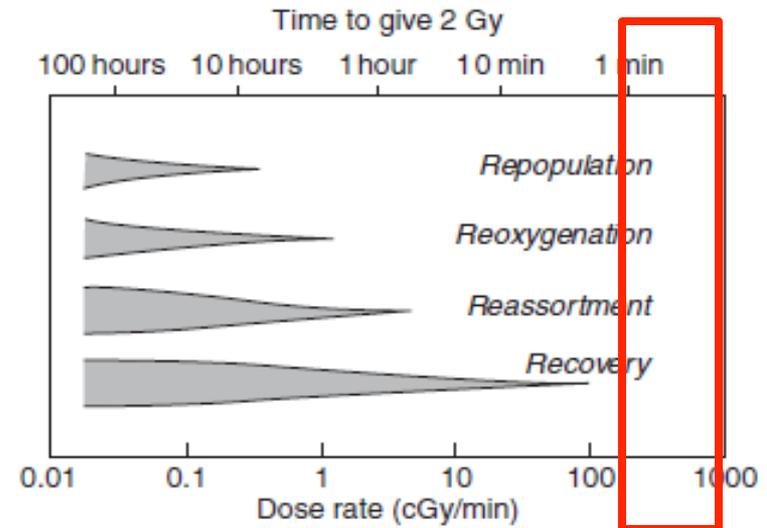
Conventional radiation

X-ray, accelerated particles *etc.*



AREAL

Ultrafast/Ultrashort electron beam



Albert van der Kogel. Basic Clinical Radiobiology. Ed. M. Joiner, 2009, Hodder Arnold Press

При повышении мощности дозы уменьшается время облучения. Клетки облучали до 1 мин. Стало возможным наблюдать образование первичных повреждений и, следовательно, обнаруженный эффект мощности дозы основан не на теории 4R, а на различии первичных повреждений.

Результаты: повреждение и репарация ДНК

Поскольку применение сверхкороткого импульсного электронного пучка позволяет описать первичные радиобиологические эффекты, можно предположить, что наблюдаемое влияние дозы на повреждение/ восстановление ДНК в основном вызвано первичными поражениями, появляющимися в момент облучения. Механизмы, лежащие в основе проявления эффекта мощности дозы зависят от времени облучения. **При снижении мощности дозы увеличивается время облучения. При этом в процессе облучения становится возможным протекание ряда биологических процессов и модификация эффектов радиации. Теория 4R.**

Таким образом, данная теория представлена на слайде слева, где представлено время активация данных процессов **при рентгеновском облучении в 2 Гр с разными мощностями дозы**. Однако можно увидеть, что эффект процесса восстановления не обнаруживается ранее 2 мин. **В нашем же случае стало возможно облучать клетки в сопоставимых дозах с временем облучения до 1 мин.** Образцы также помещались на лед....

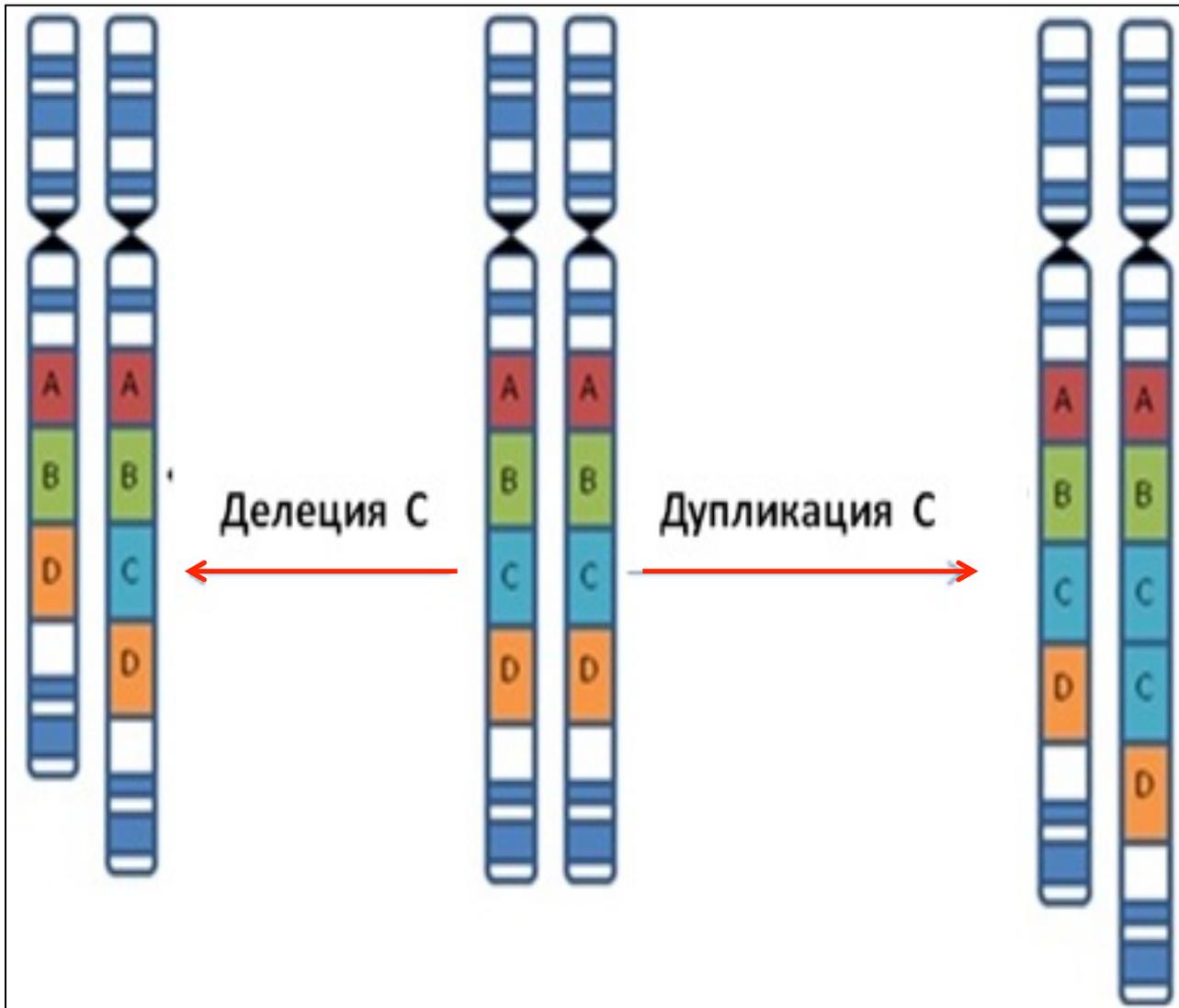
Таким образом, стало возможным наблюдать образование первичных повреждений и, следовательно, обнаруженный нами эффект мощности дозы основан не на теории 4R, а на различии первичных повреждений при облучении разными мощностями дозы.

Вариация числа копий последовательностей ДНК (CNV)

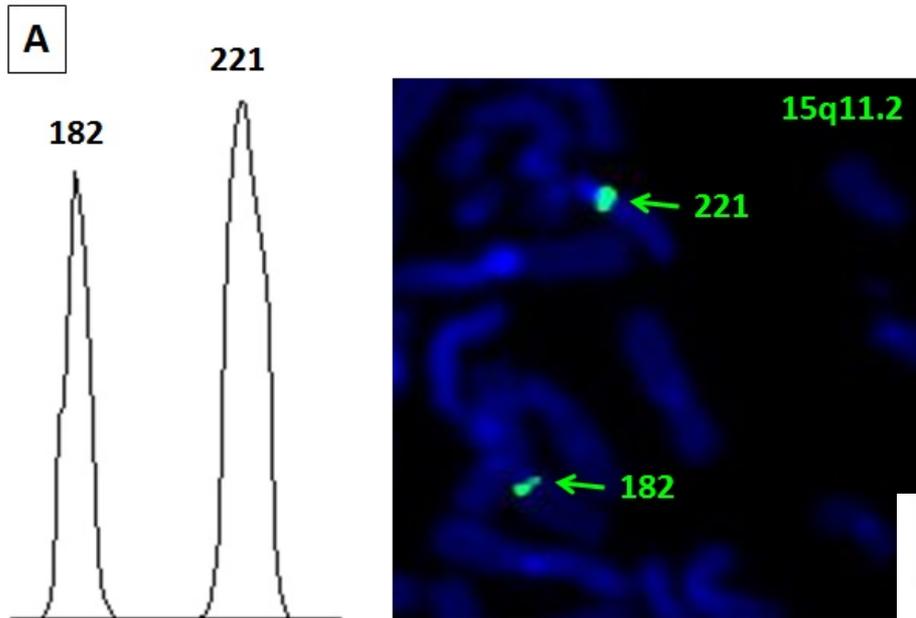
Вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов размером от 50 до нескольких миллионов пар оснований. CNV возникают в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. **CNV составляют 9% человеческого генома.**

CNV могут обуславливать предрасположенность к развитию таких заболеваний как рак, диабет, аутизм, шизофрения и сердечно-сосудистые пороки.

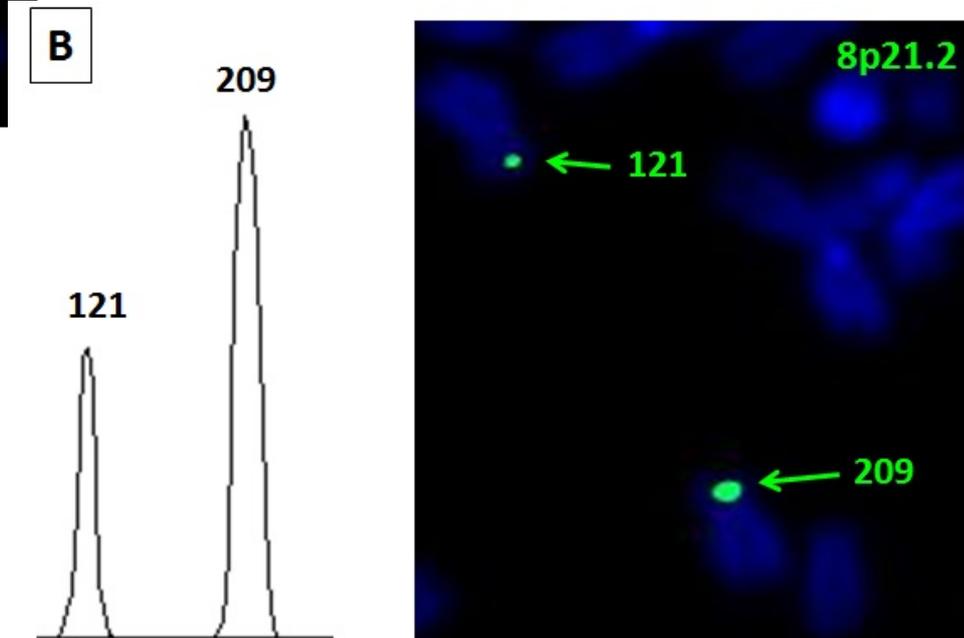
Вариация числа копий последовательностей ДНК



Анализ интенсивности флюоресценции с применением программы Scion Image



Интенсивности флюоресценции CNVs в локусе 8p21.2 гомологичных хромосом



Интенсивности флюоресценции CNVs в локусе 15q11.2 гомологичных хромосом

- Полученные результаты показывают, что афлатоксин В1 может индуцировать нестабильность CNV в 8p21.2 и 15q11.2 локусах в культуре лейкоцитов человека.

Наблюдавшийся эффект был результатом делеций в исследованных локусах.

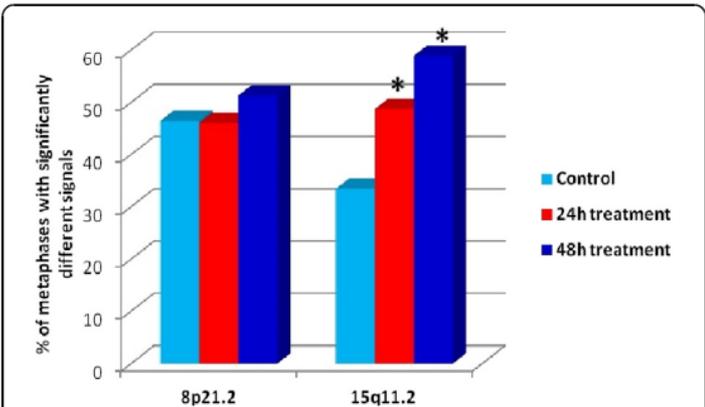


Figure 1 Percentage of metaphases with significantly different signals in 8p21.2 and 15q11.2 in AFB1-treated human leukocytes. Fluorescence intensities of signals in chromosome regions 8p21.2 and 15q11.2 were measured in 150 metaphases for each loci by Scion Image program. AFB1 induced statistically significant increase in metaphases with significant differences in CNVs signals between homologous chromosomes in region 15q11.2 in comparison with control (Chi-square test, *p < 0.05).

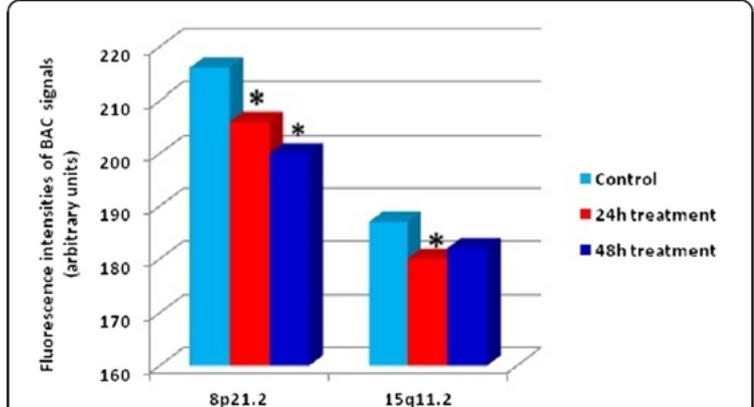


Figure 2 Fluorescence intensities of signals in chromosome regions 8p21.2 and 15q11.2 in AFB1-treated human leukocytes. Fluorescence intensities in chromosome regions 8p21.2 and 15q11.2 were measured in 150 metaphases for each loci by Scion Image program. AFB1 decreased mean values of fluorescence intensities of signals in regions 8p21.2 and 15q11.2 in comparison with controls (Mann-Whitney W-test, *p < 0.05).

RESEARCH

Open Access

Influence of aflatoxin B1 on copy number variants in human leukocytes in vitro

Tigran Harutyunyan¹, Galina Hovhannisyanyan¹, Nelly Babayan^{1,2}, Moneeb AK Othman³, Thomas Liehr³ and Rouben Aroutiounian^{1*}

Abstract

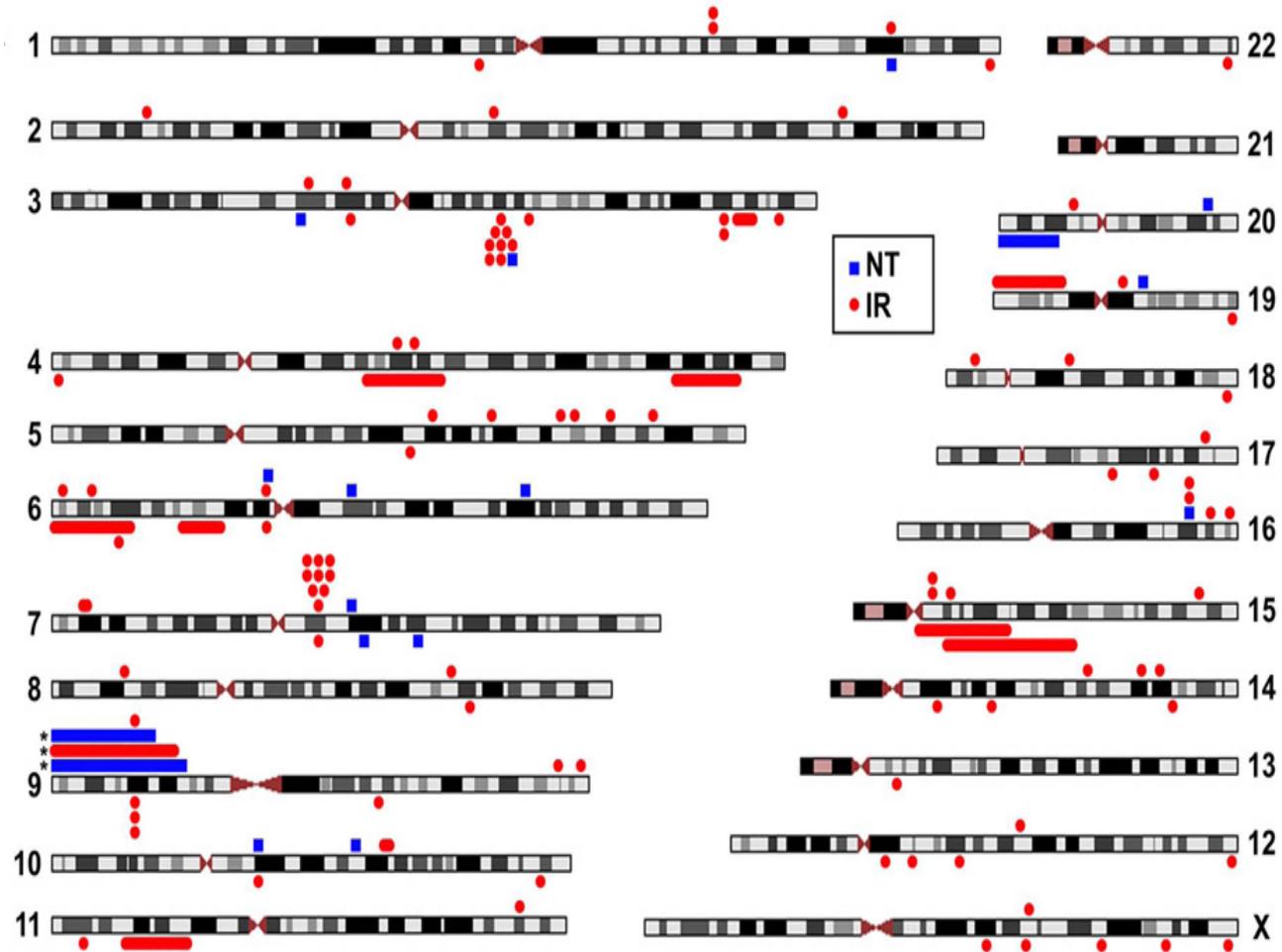
Background: Aflatoxin B1 (AFB1) is a mycotoxin produced by *Aspergillus spec.* The latter are worldwide contaminants of food with mutagenic and carcinogenic activities in animals and humans. AFB1 was shown to have deleterious effects on metabolism of eukaryotes in many model systems, including the ability to inhibit DNA replication. An agent that disturbs DNA replication may also have the potential to induce de novo DNA copy number variations (CNVs).

Results: Blood samples of three clinically healthy carriers were treated in vitro with AFB1 and chromosome preparations were subjected to parental origin determination fluorescence *in situ* hybridization (pod-FISH). Probes able to visualize CNVs in 8p21.2 and 15q11.2 were applied. In this setting here for the first time an influence of AFB1 on molecular-cytogenetically detectable CNVs could be shown.

Conclusions: The obtained results indicate that: (i) pod-FISH is a single cell directed, sensitive and suitable method for the analysis of mutagen induced CNVs, (ii) AFB1 has the potential to induce *in vitro* instability of known CNVs in human leukocytes.

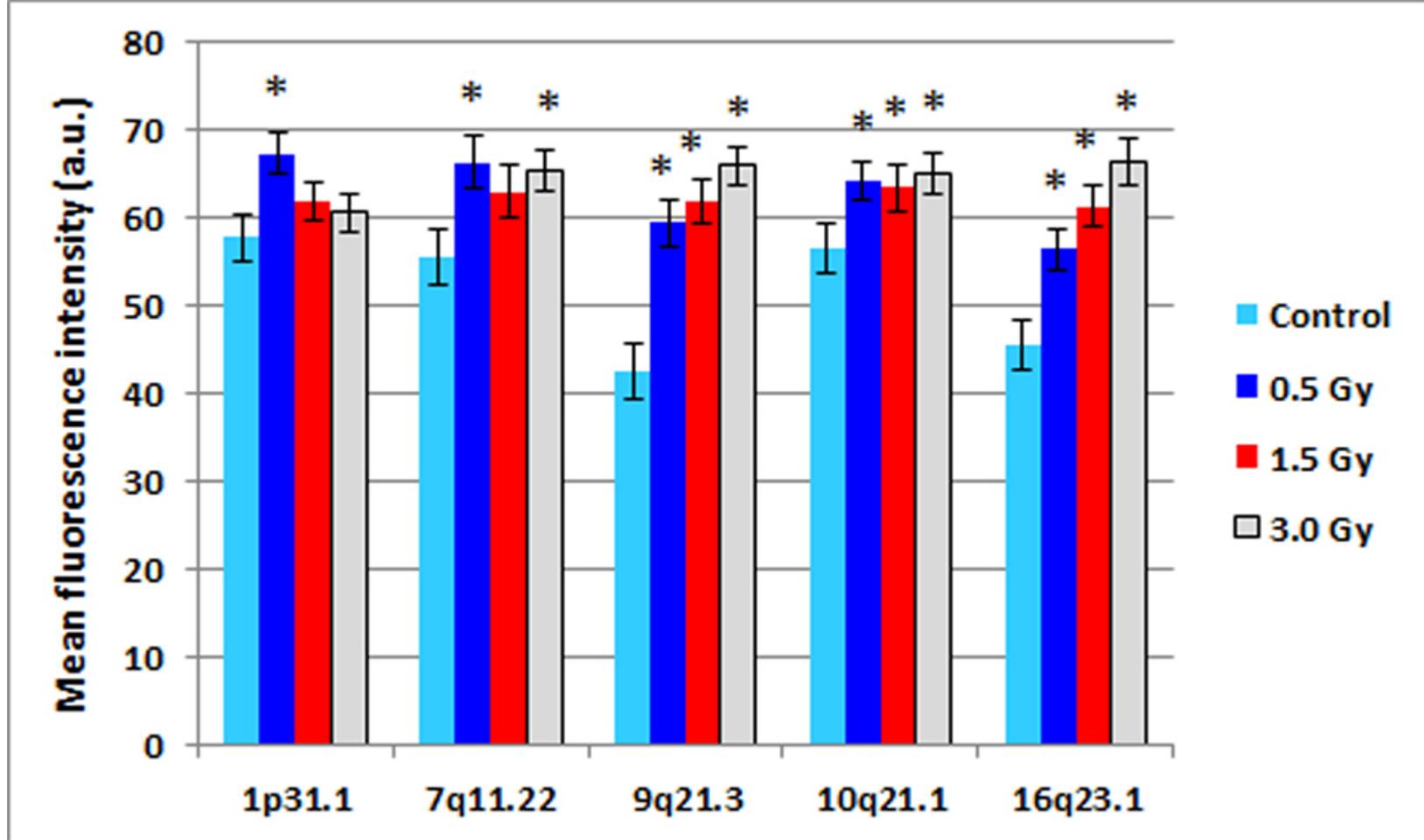
Keywords: Aflatoxin B1, Mycotoxins, Copy number variation, Parental origin determination fluorescence *in situ* hybridization (pod-FISH)

Низкие дозы (1.5-3 Gy) ионизирующей радиации индуцируют CNV в клетках человека



CNV анализировали методом флуоресцентной in situ гибридизации в метафазах культуры лимфоцитов крови человека, облученные (**0.5-3.0 Gy**, 3 MeV, 2 Gy/min, 2 Hz) линейным лазерным ускорителем электронов AREAL. Цельную кровь культивировали 72 ч.

Полученные результаты показывают, что облучение ультракороткими импульсами ускоренных электронов может индуцировать дупликации в хромосомных локусах **1p31.1, 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1** по сравнению с контролем.



Средние уровни интенсивностей флюоресценции ВАС сигналов в CNV локусах.

При облучении клеток ультракороткими импульсами ускоренных электронов в дозе **0.5 Gy** дубликации индуцируются **во всех исследованных хромосомных локусах**;

при облучении в дозе 1.5 Gy дубликации индуцируются в 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 локусах, а при облучении в дозе 3.0 Gy дубликации индуцируются в 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 локусах. *-p<0.05 по сравнению с контролем.

Мы применили F O C I

(анализ восстановления DSB ДНК)

Считается, что ДНК-DSB являются основными спусковыми механизмами клеточных процессов, которые отвечают за реакцию на воздействие ионизирующей радиации.

Восстановление ДНК DSB происходит довольно медленно, и если они остаются невосстановленными, это приводит к серьезным цитогенетическим повреждениям, гибели клеток, инактивации генов-супрессоров или активации онкогенов.

ДНК DSB представляет собой ключевой механизм, посредством которого лучевая терапия и некоторые химиотерапевтические агенты могут убивать раковые клетки.

Использовался иммуноцитохимический анализ белков, участвующих в процессах индукции DSB ДНК

FOCI, индуцированные ионизирующим излучением, являются субъядерными областями на участках повреждения ДНК или вблизи них и состоят из белков репарации разрывов двойной цепи

Гистон H2AX после его фосфорилирования называется **гамма-H2AX**, как реакция на образование DSB.

Это - вариант гистона H2A, который представляет компонент структуры нуклеосом, вокруг которых свернута ДНК.

Фосфорилирование H2AX приводит к вовлечению многих других белков к **восстановлению ДНК** с последующим образованием FOCI.

Фосфорилирование H2AX происходит с **участием киназ, которые являются сенсорами DSB ДНК.**

DSB восстанавливаются с помощью негомولوجичного соединения концов (NHEJ) и гомولوجичной рекомбинации (HR).

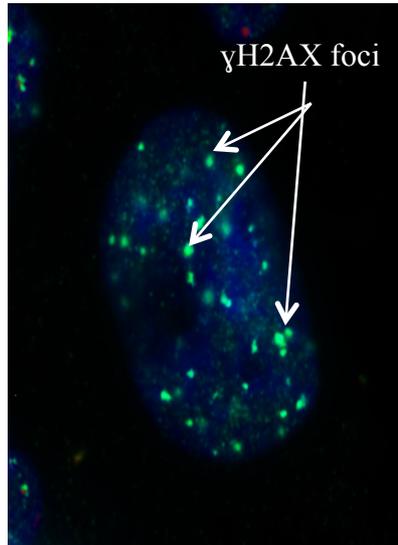
Их образование включает ДНК-зависимую протеинкиназу (**DNA-PKcs**).

В настоящее время FOCI используются в качестве биомаркеров в радиотерапии, диагностике и биодозиметрии.

Обнаружение образования и восстановления DSB

после облучения ультракоротким пучком электронов в фибробластах человека с использованием иммуногистохимических методов.

FOCI содержат сотни тысяч копий различных белков, участвующих в восстановлении DSB

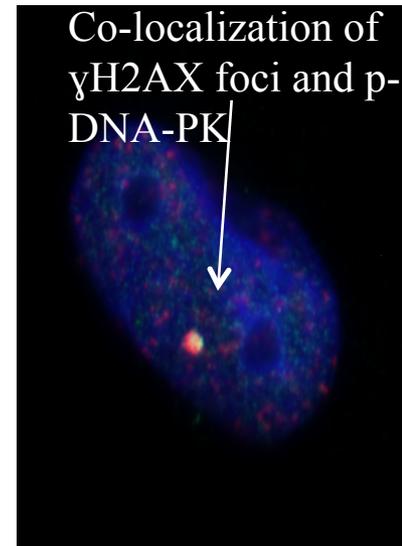


Визуализация локализованных γH2AX foci в облученных клетках

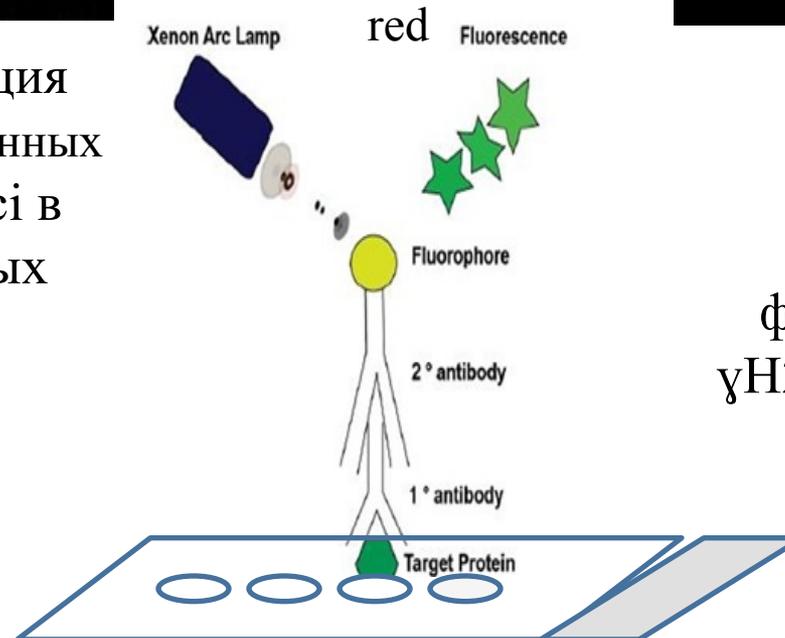
Fluorophores

γH2AX foci – Fluorescein (FITC) – green.

p-DNA-PK - Texas Red -



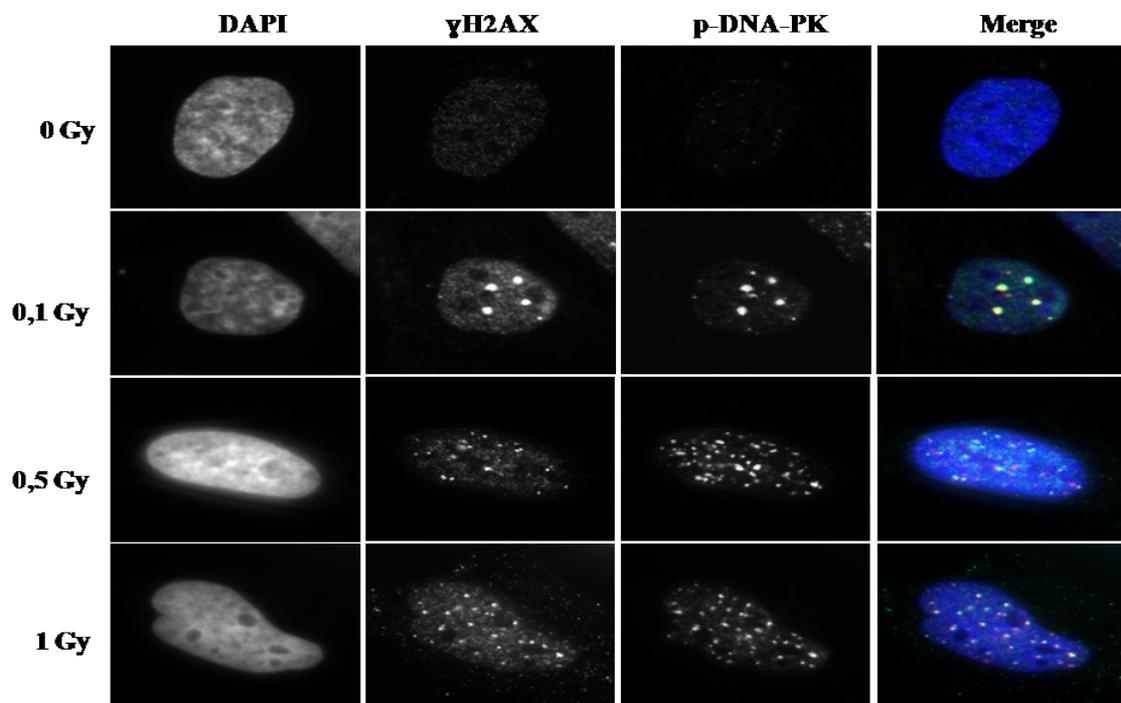
При двойном окрашивании наблюдается колокализация фосфорилированных γH2AX и белка DNA-PK



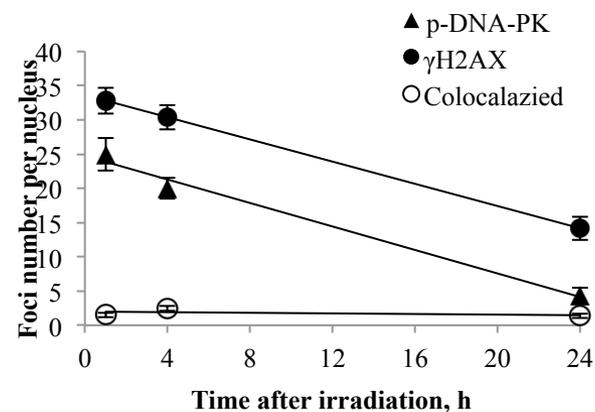
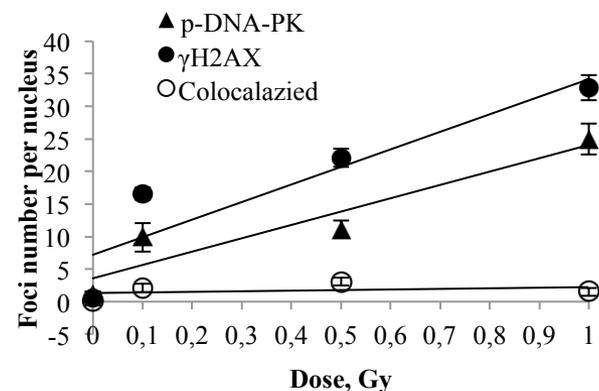
Результаты: повреждение и репарация ДНК

Метод фокусов ДНК

Действие ультракоротких импульсов электронов на образование и репарацию DSB



The γ H2AX and p-DNA-PK foci and their co-localization at 1h post-irradiation in MRC5 cell line

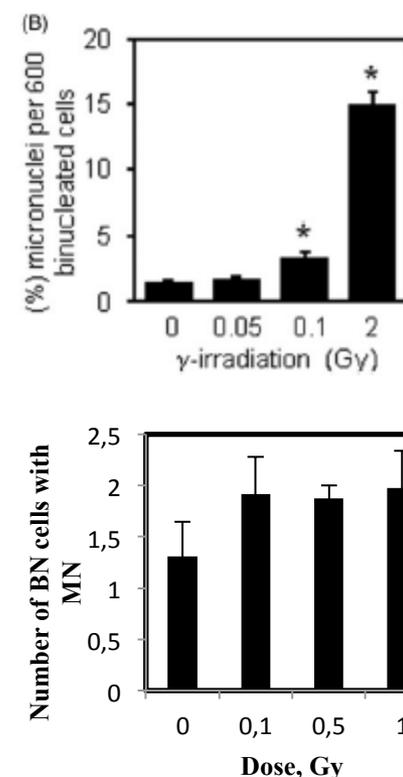
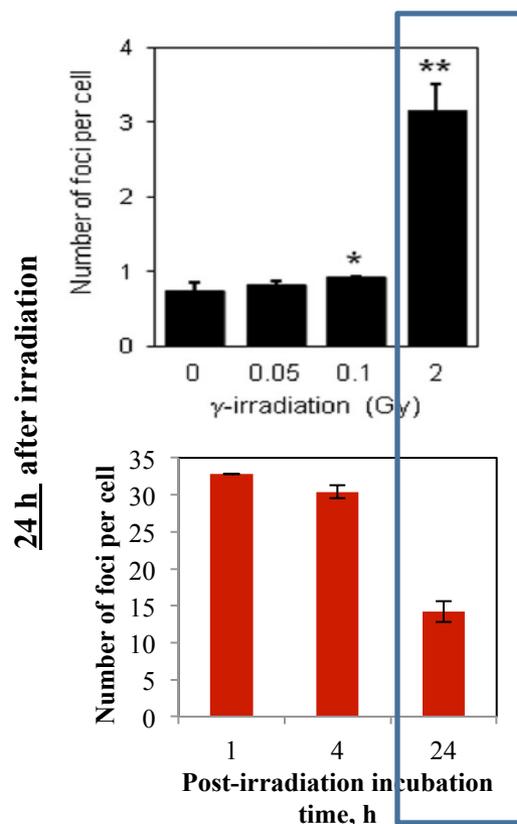
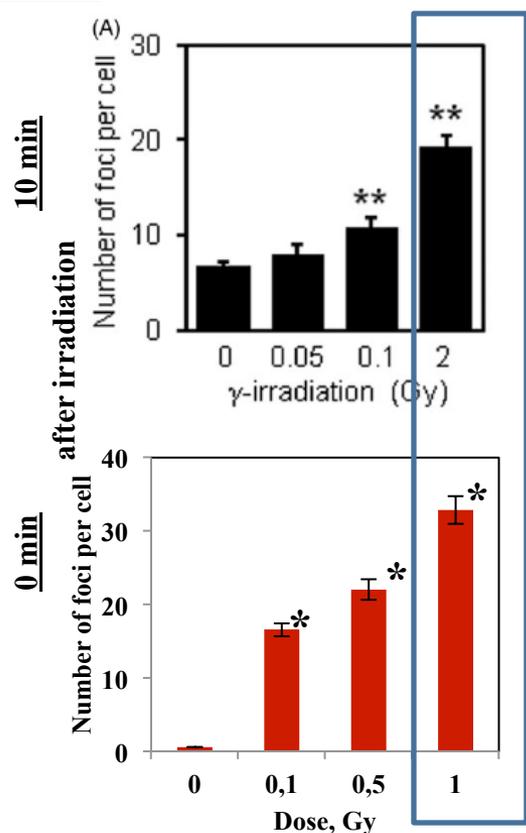


Результаты: повреждение и репарация ДНК *

Сравнение наших данных с гамма-излучением

Методы фокусов ДНК и МЯ

γ-облучение



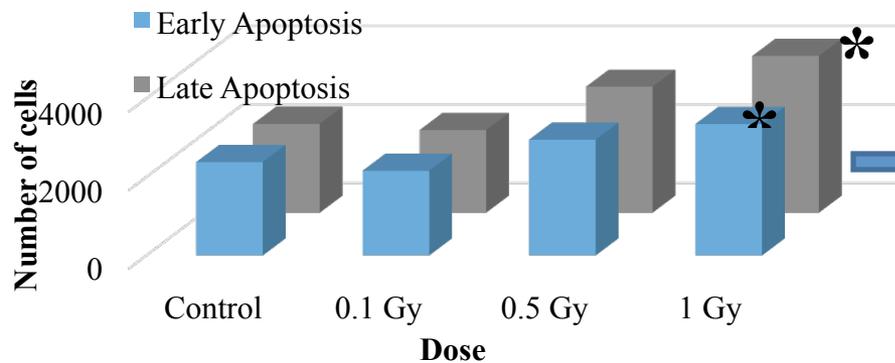
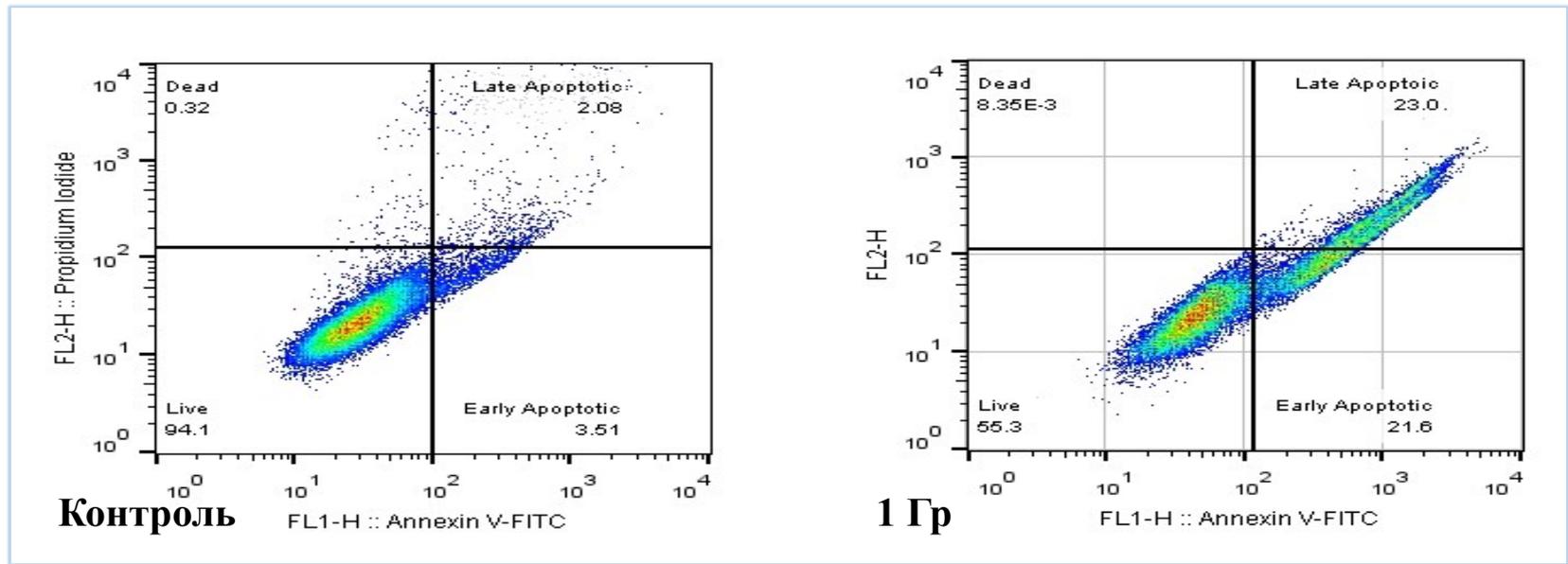
Yim et al., 2017, VOL. 93, NO. 11, 1197–1206

Нами показана более высокая повреждающая способность потока электронов без индукции геномной нестабильности.



Результаты: Выживаемость клеток

Метод: Проточная цитометрия Annexin V-FITC/7AAD окрашенных клеток



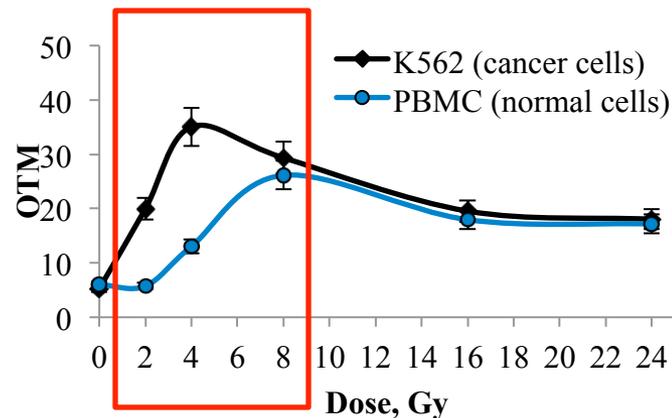
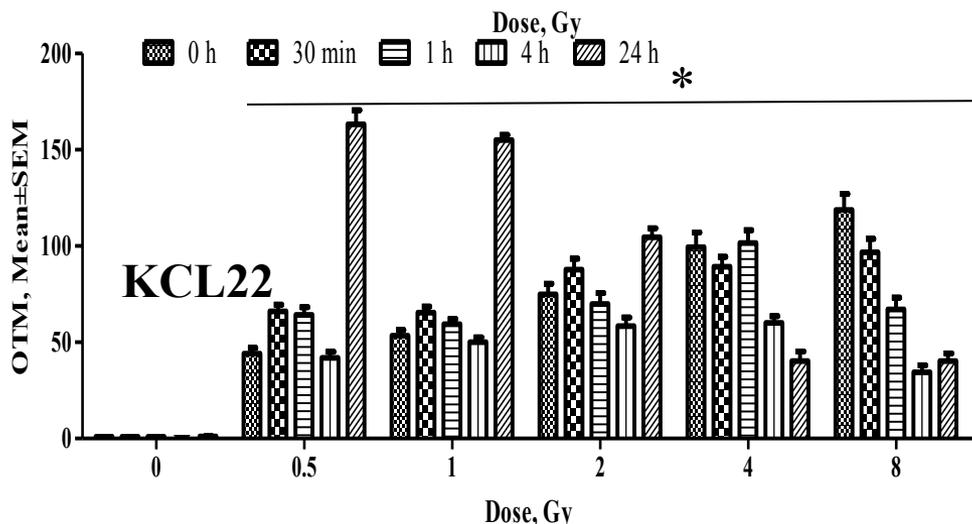
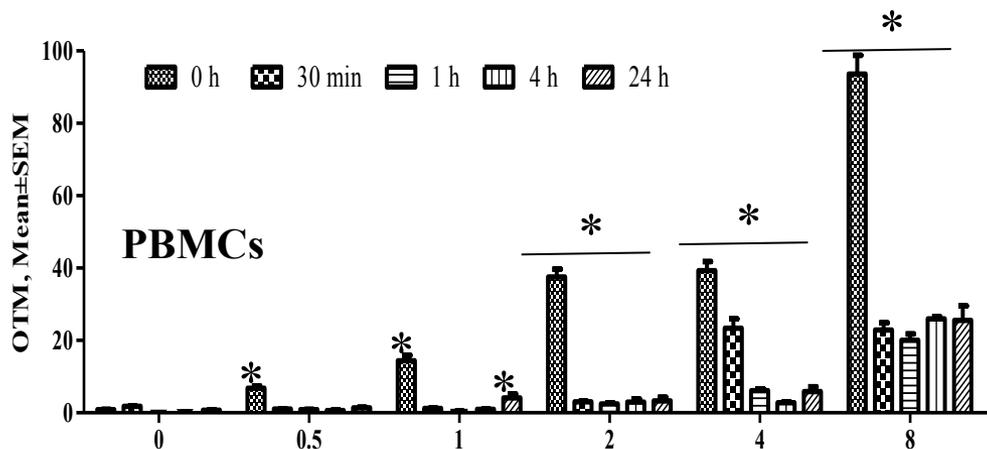
40% апоптотических клеток
MRC5,
24 ч после облучения
дозой 1 Гр

Образованные и нерепарабельные γ -H2AX приводят к апоптотической смерти клеток

Различия в первичных повреждениях ДНК и репарации между нормальными и опухолевыми клетками

Результаты: повреждение ДНК и кинетика репарации в нормальных и опухолевых клетках человека

Метод: Comet assay



The level of DNA-damage in PBMC (blood normal cells, female) and KCL22 cell line (blood cancer cells, female) **after 3 hours of irradiation**

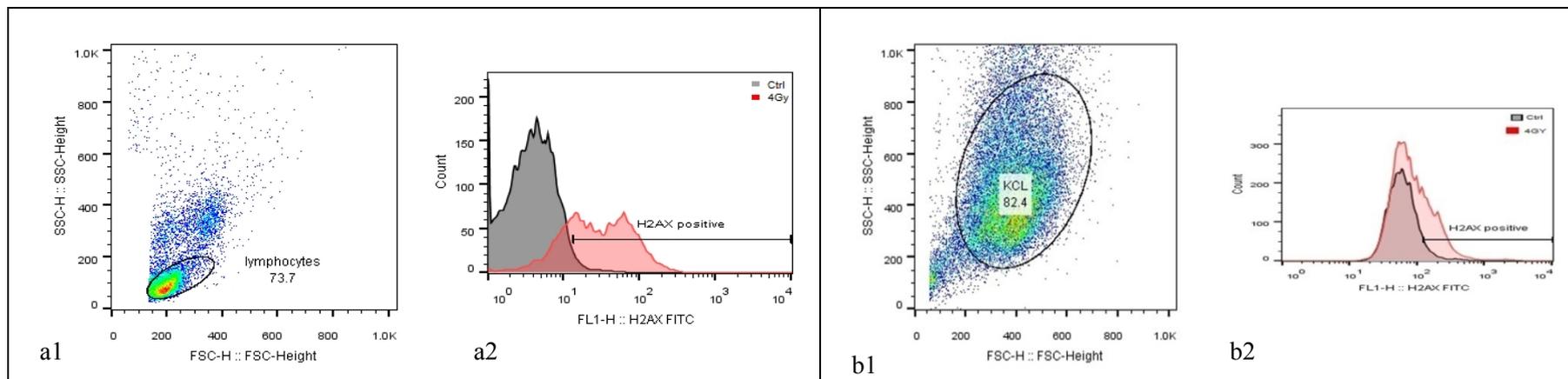
При сверх-высоких дозах облучения (>10Гр) различия в репарации между нормальными и опухолевыми клетками не наблюдается (через 3 часа)

Но при меньших дозах и сроках после облучения-слева: в нормальных клетках, при любых повреждениях активируются все возможные процессы репарации, чтобы избежать геномных повреждений и смерти клеток. В опухолевых же клетках только при летальных дозах

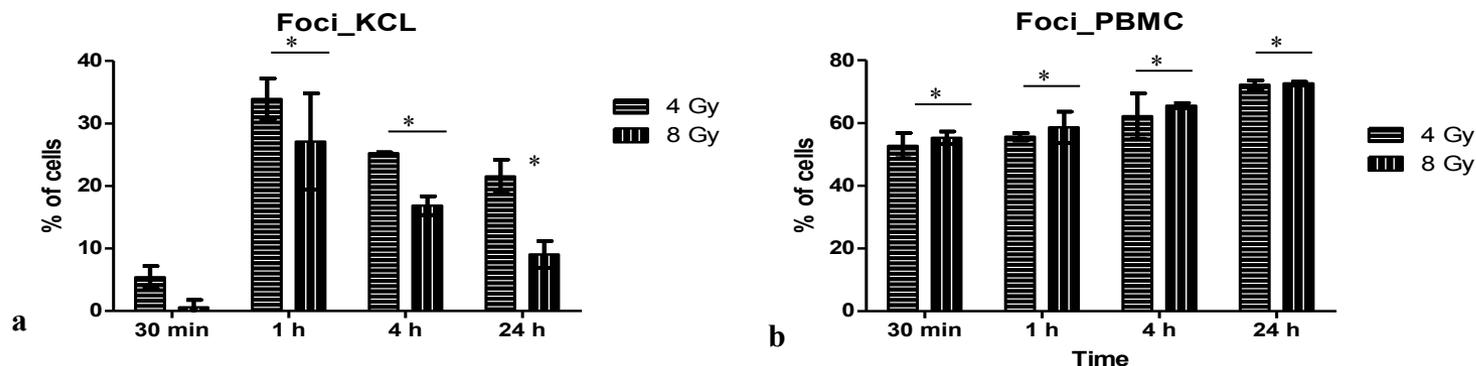
Метод: Проточная цитометрия

PMBC

KCL22



The representative dot-plot (a1, b1) and histogram (a2, b2) of the level of γ -H2AX foci in PBMCs (a) and KCL22 cells (b) after sub-lethal (4 Gy) dose of irradiation



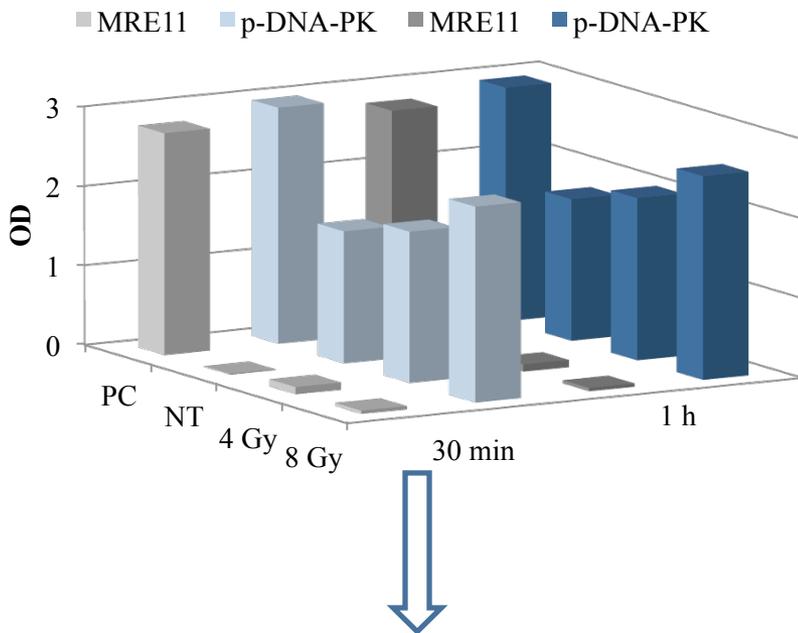
The kinetics of γ -H2AX foci formation in cancer (a) and normal (b) cells after lethal (8 Gy) and sub-lethal (4 Gy) doses of irradiation. *- $p < 0.05$ in comparison with non-irradiated cells

Анализ кинетики репарации только двуниевых разрывов дал иную картину

Результаты: Путь репарации ДР ДНК Метод: Colorimetric cell-based ELISA assay

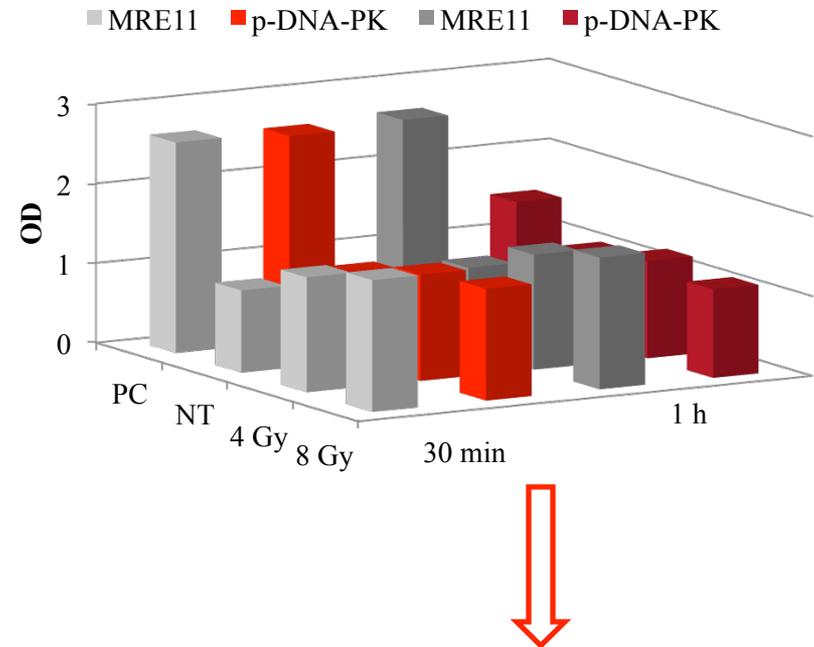
Активация гомологичной рекомбинации (HR) и соединения нехомологичных концов (NHEJ)
в нормальных и опухолевых клетках

PBMCs



Активация только NHEJ
(by DNA-PK expression)

KCL22



NHEJ and HRR
(by MRE11A expression)

- Мы исследовали активацию процессов [гомологичной рекомбинации \(HR\)](#) и соединение нехомологичных концов (NHEJ) в клетках через 30 мин и 1 ч после облучения.
- **В нормальных клетках наблюдалась активация только NHEJ пути репарации.**
- **В опухолевых клетках активизируются как HR, так и NHEJ пути репарации ДР ДНК - показано дозозависимое повышение уровня MRE11 и DNA-ПК белков, которое сохранялось на протяжении 1 ч после облучения. РС-позитивный контроль; NT-non treated**
- *DNA-PKcs (протеинкиназа) is required for the [non-homologous end joining \(NHEJ\)](#).*
- *Белок репарации двойных разрывов нитей MRE11A участвует в [гомологичной рекомбинации HR](#)*

Последующие исследования

В дальнейшем мы собираемся исследовать также другие пути репарации:

BER (замена пары оснований),

A-NHEJ (альтернативное соединение негомологичных концов),

ATM kinase/ATR kinase, RAD51a (механизмы, основанные на анализе различных белков, вовлеченных в процессы репарации).

Белки, (ответственные за пути репарации) экспрессию которых собираемся исследовать : Для BER – это APEX1; Для A-NHEJ – это PARP1

Мы собираемся также исследовать эпигенетическую регуляцию сети активации различных репарационных систем в опухолевых и нормальных клетках, а также изменять радиочувствительность клеток путем отключения той или иной репарационной системы в опухолевых клетках.

Отключение репарационной системы будем проводить с помощью методики интерференции РНК (siRNAs), отключая экспрессию определенных белков, ответственных за определенный путь репарации (BER - APEX1 Ref-1 siRNA; NHEJ - Ku-70 siRNA; A-NHEJ- PARP-1 siRNA; HR- Exo1 siRNA)

- **BER (Base excision repair)** corrects DNA damage from oxidation, deamination and alkylation.
- **ATM serine/threonine kinase**, is a [serine/threonine protein kinase](#) that is recruited and activated by [DNA double-strand breaks](#).
- **RAD51** is a eukaryotic [gene](#). The [enzyme](#) encoded by this gene is a member of the RAD51 protein family which assists in repair of [DNA double strand breaks](#).
- **APEX1** (Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1) is a Protein Coding gene.
- **Ku70** вместе с белком [Ku80](#) составляют гетеродимерный [Ku-белок](#), который связывается с двуцепочечными разрывами в [ДНК](#) и участвует в [негомологичном соединении концов](#) цепи (NHEJ)
- **PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymerase)** has a role in repair of single-stranded DNA (ssDNA) breaks.
- **EXO 1** gene encodes a protein with 5' to 3' exonuclease activity as well as an RNase H activity

Таким образом, на ускорителе “AREAL” были проведены биодозиметрические базовые исследования (выживаемость клеток, повреждение ДНК, эффект мощности дозы) ультракороткого импульсного электронного облучения с использованием нормальных и опухолевых клеток человека.

Было показано, что облучение клеток ультракороткими импульсами электронов приводит к образованию повреждений ДНК и гибели клеток путем апоптоза.

Большинство повреждений ДНК, индуцированных облучением НМД, а также часть повреждений индуцированных облучением ВМД, репарировалось через 24 часа.

Было выявлено участие ДНК-зависимой протеинкиназы при репарации повреждений ДНК. После репарации ДНК наблюдалось de novo изменение вариаций числа копий последовательностей ДНК.

- **Основной целью дальнейших исследований является сравнение радиобиологической эффективности лазер-генерируемого импульсного сверхбыстрого электронного облучения с эффективностью облучения непрерывным электронным пучком и/или тяжелыми ионами, рентгеновским облучением в условиях *in vitro*.**

- **Сравнение радиобиологических эффектов облучений непрерывным и импульсным сверхбыстрым пучком электронов.**

Для достижения поставленной цели будут реализованы следующие задачи:

- Анализ формирования двунитевых разрывов ДНК в клетках человека после облучения (Гамма-H2AX)
- Исследование кинетики и механизма репарации ДНК в клетках человека после облучения (ATM, ДНК-ПК, ATR, RAD51)
- Определение путей клеточной гибели (апоптоз, аутофагия, репродуктивная клеточная смерть) в клетках человека после облучения
- Изучение образования *CNV de novo* в клетках человека после облучения
- Исследование “эффекта свидетеля” (bystander effect) путем определения уровня цитокинов, продуцируемыми макрофагами и лимфоцитами человека после облучения
- **Изучение эпигенетического влияния облучения на основе определения уровня метилирования ДНК в клетках человека и/или тяжелыми ионами, рентгеновским облучением в нормальных и опухолевых клетках человека для оценки относительной биологической эффективности сверхбыстрого импульсного электронного облучения**

V.M. Tsakanov, et al.

AREAL low energy electron beam
applications in life and materials
sciences.

Nuclear Instruments and Methods in
Physics. Research Section A: Accelerators,
Spectrometers, Detectors and Associated
Equipment

**Nelly Babayan, Galina Hovhannisyan, Bagrat
Grigoryan, Ruzanna Grigoryan, Natalia Sarkisyan,
Gohar Tsakanova, Samvel Haroutiunian,
Rouben Aroutiounian**

**Dose-rate effect of ultrashort electron beam
radiation on DNA damage and repair in vitro.
Journal of Radiation Research, 2017.**

<https://doi.org/10.1093/jrr/rrx035>

Gender differences in DNA damage/repair after laser-generated ultrafast electron beam irradiation

**Babayan N, Grigoryan B, Hovhannisyan G,
Tadevosyan G, Khondkaryan L, Grigoryan R,
Sarkisyan N, Aroutiounian R**

**International Journal of Radiology & Radiation
Therapy, Volume, 5 Issue 2, 2018,**

**Наши исследования осуществляются по гранту
Государственного комитета по науке РА.**

**Мы выражаем нашу благодарность нашим
коллегам из AREAL, которые создали
возможность реализации нашей работы.**

**Мы благодарим профессора Андреяна Осипова
из Федерального медицинского биофизического
центра им. А.И.Бурназяна ФМБА России
за активную помощь.**

Спасибо за внимание!

