УДК 577.346:539.1.04

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОТОНОВ И ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ДНК В РАСТВОРЕ

© 2022 г. О. М. Котб^{1, 2}, Д. С. Брожик³, В. Н. Вербенко³, Е. П. Гулевич³, В. Ф. Ежов^{1, 3}, Л. Л. Карлин³, Ф. А. Пак³, С. В. Пастон^{1, *}, А. И. Халиков³

 $^{1}\Phi$ едеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

"Санкт-Петербургский государственный университет", Санкт-Петербург, Россия

²Кафедра физики, Факультет наук, Университет Загазиг, Загазиг, Египет

³Федеральное государственное бюджетное учреждение

"Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Санкт-Петербург, Россия

> **E-mail: s.v.paston@spbu.ru* Поступила в редакцию 18.04.2022 г. После доработки 13.05.2022 г. Принята к публикации 23.05.2022 г.

Выполнено сравнение повреждений в структуре ДНК под действием излучений с одинаковой $Л\Pi \Im = 0.3 \text{ КуB} \cdot \text{мкm}^{-1}$: гамма-излучения и протонов с энергией 1 ГэВ при поглощенных дозах 0–100 Гр в растворах 5 и 150 мМ NaCl. Обнаружено, что протонное облучение вызывает меньшее падение температуры плавления ДНК, чем гамма-облучение. Дефекты вторичной структуры ДНК более значительны в гамма-облученных растворах. В ДНК, облученной протонами, наблюдаются признаки локальных множественных повреждений. Установлено, что протонное излучение имеет больший летальный эффект, чем гамма-излучение.

DOI: 10.31857/S0367676522090149

введение

Облучение ионизирующей радиацией широко применяется при лечении онкологических заболеваний. Этот метод показан главным образом в тех случаях, когда опухоль не может быть удалена радикально хирургическим путем, или при наличии противопоказаний к оперативному вмешательству. До 70% онкологических больных подвергаются лучевой терапии как самостоятельному методу или в качестве компонента комбинированного лечения (в сочетании с хирургическим лечением, химиотерапией) [1]. Принцип действия радиационной терапии основан на фундаментальном законе, сформулированном еще в 1906 г. И. Бергонье и Л. Трибондо: клетки тем более радиочувствительны, чем менее они дифференцированы и чем интенсивнее они делятся [2]. Гибель таких клеток наступает в процессе деления, в результате повреждений в ДНК. Таким образом, для клеток злокачественной опухоли, быстро и неограниченно пролиферирующих и менее зрелых, чем клетки здоровой ткани, летальная доза будет ниже, чем для окружающих опухоль здоровых клеток [1, 3].

В настоящее время разработано множество методик радиационной терапии, направленных

на усиление избирательности повреждения клеток опухоли и ослабления радиационной нагрузки на здоровые ткани [3-5]. Различные виды излучений характеризуются разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) и зависимостью ЛПЭ от глубины проникновения в организм. Для фотонов эта зависимость имеет максимум в самом начале пробега частицы (для излучения ⁶⁰Со с энергией фотонов 1.3 МэВ на глубине около 2 см в воде) [2], и затем медленно спадает. Такое распределение поглощенной энергии не благоприятно для лечения опухолей, локализованных глубоко внутри организма. так как доза радиации. полученная здоровыми тканями, оказывается выше, чем полученная опухолью. В случае же тяжелых заряженных частиц (протонов, α-частиц, ядер углерода) зависимость ЛПЭ от длины пробега в ткани имеет характерный максимум в конце трека (пик Брэгга), положение которого можно подобрать, варьируя начальную энергию частицы, так чтобы максимальная плотность ионизаций пришлась на опухоль [2]. Также в терапии используются пучки адронов высоких энергий, вдали от пика Брэгга – это так называемая технология "pencil beam", особенно эффективная при лечении внутричерепных патологий [3-5].

Точная фокусировка, малое сечение пучка, практически не рассеивающегося в биологических тканях – неоспоримые преимущества этого метода. Подобный метод лечения успешно применялся в течение десятков лет в Комплексе лучевой терапии "на пролет" на базе ускорителя протонов СЦ-1000 в ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ "Курчатовский институт" (Гатчинский метод) [5–7]. На счету специалистов Комплекса более 1300 излеченных больных. Протоны высоких энергий имеют низкую ЛПЭ, сравнимую с ЛПЭ гамма-излучения [3]. Однако, взаимодействие этих ионизирующих частиц с веществом существенно различаются: гамма-кванты вызывают первичную ионизацию атомов в результате фотоэффекта и комптоновского эффекта, возникшие при этом быстрые электроны в свою очередь производят ионизацию и возбуждение окружающих атомов за счет электромагнитного взаимодействия с электронными оболочками. Треки этих электронов в веществе искривлены, длина пробега варьирует от 1 до 1000 мкм в зависимости от энергии фотона, переданной электрону. Протоны высоких энергий непосредственно вызывают множественные ионизации и возбуждение атомов в результате электромагнитного взаимодействия с электронными оболочками [2]. Целью данной работы является анализ повреждений в молекуле ДНК под действием у-излучения ⁶⁰Со (используется в терапевтическом устройстве гамма-нож) и протонов с энергией 1 ГэВ (на синхроциклотроне СЦ-1000 Санкт-Петербургского НИИ ядерной физики НИЦ "Курчатовский институт"). Эти два вида излучения имеют одинаковое значение $\Pi\Pi \Theta = 0.3 \text{ к} \oplus \text{B} \cdot \text{мкm}^{-1}$.

Радиационные нарушения в структуре ДНК подразделяют на одиночные и локальные множественные повреждения (ЛМП) [2, 8]. Одиночные повреждения являются, в основном, результатом косвенного действия радиации, т.е. взаимодействия макромолекулы с продуктами радиолиза воды. Эти повреждения быстро и эффективно репарируются в клетках. ЛМП — это два и более одиночных повреждений, расположенные на расстоянии менее 10 пар оснований. Такие повреждения труднорепарируемые либо нерепарируемые, особенно если нарушения возникли на обеих комплиментарных нитях ДНК. ЛМП играют основную роль в радиационной гибели клетки [8].

В данной работе нарушения в структуре ДНК изучали методом спектрофотометрического плавления [9, 10]. На параметры перехода спираль-клубок в облучаемой макромолекуле влияют различные типы радиационных повреждений. Одно- и двухцепочечные разрывы, разрушение, модификация и высвобождение азотистых оснований приводят к дестабилизации вторичной структуры и понижают температуру плавления ДНК (T_m) [9–12], в то время как межнитевые сшивки увеличивают T_m [9, 10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали натриевую соль ДНК из тимуса теленка (Sigma) молекулярной массы $M = (6.3 \pm 0.5) \cdot 10^6$ Da, химически чистый NaCl, деионизованную воду. Растворы NaCl необходимой концентрации готовили из насыщенного раствора.

Облучение протонами с энергией 1 ГэВ проводили в аэробных условиях при комнатной температуре в ФГБУ ПИЯФ им. Б.П. Константинова НИЦ "Курчатовский институт" в комплексе Лучевой терапии "на пролет" на базе ускорителя СЦ-1000. Интенсивность пучка составляла 4 Гр · мин⁻¹. Гамма-облучение проводили в аэробных условиях при комнатной температуре на установке Исследователь (⁶⁰Со) в Отделении молекулярной и радиационной биофизики ПИЯФ им. Б.П. Константинова. Мощность дозы составляла 85 Гр мин⁻¹. Концентрация ДНК в облучаемых растворах $C = (1.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-4}$ М нуклеотидов.

Измерения кривых плавления ДНК в исследуемых растворах проводили на приборе Specord 200 plus (Analytik Jena, Germany) с приставкой Пельтье, с шагом 1° , скорость нагрева $1^{\circ} \cdot \text{мин}^{-1}$. Использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути l = 1 см. В экспериментах измеряли оптическое поглощение раствора в максимуме поглощения ДНК D₂₆₀ в зависимости от температуры Т. Сбор данных и управление экспериментом осуществлялись с помощью программы WinASPECT (Analytik Jena, Germany). Обработку данных проводили в пакете OriginPro. Значение температуры плавления ДНК Т_т определяли по положению максимума на дифференциальной кривой плавления $\frac{dD_{260}}{dT}$ [13]. Прежде, чем присту-пить к плавлению, регистрировали спектр УФ поглощения ДНК при температуре 25°С. После завершения плавления регистрировали спектр при максимальной температуре 95°С. Далее проводили охлаждение раствора до 25°С в течение 10 мин и регистрировали спектр ДНК. Используя полученные спектры поглощения, определяли величину гиперхромного эффекта [10]:

$$\delta = \frac{D_{260} (95^\circ) - D_{260} (25^\circ)}{D_{260} (25^\circ)} \cdot 100\%.$$
(1)



Рис. 1. Дифференциальные кривые плавления ДНК в растворах с ионной силой $\mu = 5$ мМ NaCl (*a*, *б*) и $\mu = 150$ мМ NaCl (*a*, *c*), облученной гамма-излучением (*a*, *b*) и протонным излучением (*б*, *c*). Поглощенные дозы в Гр указаны на графиках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выполнены измерения температуры плавления ДНК T_m в растворах 5 мМ NaCl и 150 мМ NaCl, облученной протонами 1 ГэВ и гамма-излучением ⁶⁰Со в дозах 0–100 Гр. На рис. 1 показаны дифференциальные кривые плавления ДНК, использованные для определения Т_т. С ростом ионной силы раствора увеличивается степень экранировки отрицательно заряженных фосфатных групп, что стабилизирует вторичную структуру ДНК. Это проявляется в увеличении температуры плавления Т_т нативной ДНК и сужении температурного интервала перехода спираль-клубок в растворе 150 мМ NaCl по сравнению с этими параметрами для раствора 5 мМ NaCl. Облучение вызывает снижение температуры плавления ДНК и уширение перехода для обеих использованных ионных сил. Отметим, что в растворе 5 мМ NaCl при дозе гамма-облучения 100 Гр определить значение температуры плавления ДНК не представляется возможным, очевидно, вследствие весьма значительного нарушения структуры ДНК, тогда как при той же дозе протонного облучения T_m определить удается (рис. 1*a*, 1*б*). Уширение интервала перехода говорит о повышении гетерогенности структуры ДНК, т.е. о появлении в цепи ДНК участков, сильно различающихся по термостабильности.

Несколько максимумов на кривой $\frac{dD_{260}}{dT} = f(T)$ наблюдается для ДНК, облученной в дозе 100 Гр при $\mu = 150$ мМ NaCl (рис. 1*в*, 1*г*) – т.е. различие в термостабильности различных участков ДНК становится еще более резким. В этих условиях можно предположить образование сшивок (как между двумя комплиментарными нитями, так и между удаленными по цепи участ-ками ДНК) в процессе облучения. Вследствие бо-



Рис. 2. Снижение температуры плавления ДНК, облученной протонным и гамма-излучением в растворах с $\mu = 5$ мM NaCl (*a*) и $\mu = 150$ мM NaCl (*b*).

лее эффективной экранировки фосфатных групп противоионами раствора, объем клубка ДНК при $\mu = 150$ мМ NaCl примерно в 2 раза меньше, чем при $\mu = 5$ мМ NaCl [14]. Размер мишени с ростом и уменьшается, но плотность ДНК в клубке возрастает, что повышает вероятность образования и сшивок (т.е. сайтов с повышенной по сравнению с нативной ДНК T_m), и ЛМП (т.е. сайтов с пониженной Т_m) [8, 15]. Так, например, если появились два близко расположенных однонитевых разрыва в одной из комплиментарных нитей ДНК, то этот участок макромолекулы денатурирует при более низкой температуре [10]. Известно, что ЛМП могут быть результатом как прямого, так и косвенного действия радиации; вероятность их появления возрастает с ростом дозы облучения [2, 8, 15, 16]. Таким образом, можно заключить, что наличие нескольких максимумов на дифференциальной кривой плавления свидетельствует о накоплении в ДНК значительного количества радиационных повреждений – сшивок и ЛМП.

На рис. 2 показаны дозовые зависимости снижения температуры плавления ДНК, облученной протонным и гамма-излучением: $\Delta T = T_{m0} - T_m$ (где T_{m0} – температура плавления нативной ДНК, T_m – температура плавления облученной ДНК). Опыт показывает, что протонное облучение вызывает меньшее падение T_m ДНК, чем гамма-облучение в растворе 150 мМ NaCl при дозах 0–100 Гр и в растворе 5 мМ NaCl при дозах 70–100 Гр.

На рис. 3 показаны дозовые зависимости гиперхромного эффекта δ в изучаемых системах. В растворе 150 мМ NaCl (рис. 36) гиперхромный эффект монотонно снижается с ростом дозы об-

лучения, причем данные, полученные при протонном и гамма-облучении ложатся на одну зависимость. Однако, в растворе 5 мМ NaCl после протонного облучения в дозах 10 и 20 Гр гиперхромизм заметно возрос, и достиг значений, даже превышающих δ нативной ДНК (рис. 3*a*). Снижение гиперхромизма под действием ионизирующего излучения вполне ожидаемо (см. формулу (1)), и объясняется нарушениями во вторичной структуре ДНК (рост величины $D_{260}^{25^{\circ}\text{C}}$) и, одновременно, снижением количества хромофоров (уменьшение величины $D_{260}^{95^{\circ}\mathrm{C}}$). Чем же можно объяснить рост гиперхромного эффекта при дозах 10 и 20 Гр протонного облучения в растворе 5 мМ NaCl (рис. 3*a*)? Можно предположить, что в этих системах при нагревании до 95°С происходит более полное нарушение стэкинг-взаимодействий между азотистыми основаниями ДНК, чем при тех же условиях в нативной макромолекуле. Это может осуществляться, если нагревание индуцирует не только расхождение комплементарных нитей, но и фрагментацию одиночных нитей [10]. Подобная фрагментация при нагревании может происходить, если в ДНК в результате облучения появились близко расположенные однонитевые разрывы в одной из комплиментарных нитей. Это предположение согласуется с литературными данными о том, что протоны высоких энергий производят как минимум в 2 раза больше однонитевых и примерно в 6 раз больше двунитевых разрывов в цепи ДНК, чем гамма-излучение [16-19]. При дозах протонного облучения больше 40 Гр гиперхромизм ДНК уже не превышает значения δ нативной ДНК (рис. 3*a*), вероятно, из-за того, что рост δ из-за фрагментации ДНК ком-

Рис. 3. Гиперхромный эффект ДНК, облученной протонным и гамма-излучением в растворах с $\mu = 5$ мМ NaCl (*a*) и $\mu = 150$ мМ NaCl (*b*).

пенсируется падением δ вследствие нарастания других радиационных эффектов: снижения количества хромофоров и частичной денатурации ДНК. Интересно отметить, что такое аномальное поведение δ наблюдается только в растворе малой ионной силы. В 150 мМ NaCl дозовые зависимости δ монотонны и одинаковы для протонного и гамма-излучения. Это может объясняться разным объемом макромолекул-мишеней в этих системах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что протонное излучение оказывает меньший разрушительный эффект на вторичную структуру ДНК, чем гамма-излучение с той же ЛПЭ и поглощенной дозой. Однако, при протонном облучении более четко наблюдаются признаки ЛМП – близко расположенные однонитевые разрывы в цепи макромолекулы. Распределение дефектов первичной и вторичной структуры в облученной ДНК определяет структура трека и распределение ионизаций и возбужденных молекул на пути ионизирующей частицы, и эти параметры различаются для гамма-излучения и высокоэнергетических протонов. Фотонное излучение характеризуется однородным распределением актов ионизации и возбуждения в облучаемом веществе, и в гамма-облученной ДНК возникают равномерно распределенные по цепи макромолекулы одиночные повреждения. В случае же протонного излучения ионизованные и возбужденные молекулы сосредоточены, в основном, в окрестности прямолинейного трека протона [20]. Этим объясняются ЛМП в цепи ДНК, подвергнутой облучению протонами. Таким образом, протоны

с энергией 1 ГэВ индуцируют труднорепарируемые либо нерепарируемые повреждения в ДНК и, следовательно, проявляют более выраженное летальное действие. Можно заключить, что высокоэнергетичные протоны более эффективны в радиационной терапии опухолей, чем гамма-излучение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Ганцев Ш.Х. Онкология. Учебник для студентов медицинских вузов. М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2006. 488 с.
- 2. *Кудряшов Ю.Б.* Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит, 2004. 443 с.
- 3. *Murshed H*. Fundamentals of radiation oncology, physical, biological, and clinical aspects. London: Elsevier, 2019. 713 p.
- Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. Basic radiation oncology. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. 575 p.
- 5. Труфанов Г.Е., Асатурян М.А., Жаринов Г.М. Лучевая терапия. Т. 2. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 200 с.
- 6. Абросимов Н.К., Воробьев А.А., Елисеев В.А. и др. // Мед. радиол. 1987. Т. 32. № 8. С. 10.
- Abrosimov N.K., Gavrikov Yu.A., Ivanov E.M. et al. // J. Phys. Conf. Ser. 2006. V. 41. P. 424.
- 8. *Газиев А.И.* // Радиац. биол. Радиоэкол. 1999. Т. 39. № 6. С. 630.
- 9. Lazurkin Yu.S., Frank-Kamenetskii M.D., Trifonov E.N. // Biopolymers. 1970. V. 9. P. 1263.
- Cantor C.R., Schimmel P.R. Biophysical chemistry. Part 3. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1980. 537 p.
- Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S.V. // J. Phys. Conf. Ser. 2018. V. 1038. Art. No. 012027.
- 12. Tankovskaia S.A., Kotb O.M., Dommes O.A., Paston S.V. // Spectrochim. Acta. Part A. 2018. V. 200. P. 85.

- 13. *Lando D.Y., Fridman A.S., Chang C.-L. et al.* // Analyt. Biochem. 2015. V. 479. P. 28.
- Kas'yanenko N.A. // J. Struct. Chem. 2006. V. 47. No. 1. P. 163.
- Georgakilas A.G., O'Neill P., Stewart R.D. // Radiat. Res. 2013. V. 180. No. 1. P. 100.
- 16. *von Sonntag C*. Free-radical-induced DNA damage and its repair. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. 528 p.
- Friedland W., Schmitt E., Kundrát P. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 1.
- Lee B.H.E., Wang C.-K.C. // Phys. Medica. 2019. V. 62. P. 140.
- Pogozelski W.K., Xapsos M.A., Blakely W.F. // Radiat. Res. 1999. V. 151. No. 4. P. 442.
- 20. Nikjoo H., Emfietzoglou D., Watanabe R., Uehara S. // Radiat. Phys. Chem. 2008. V. 77. P. 12.

Influence of high-energy protons and gamma-radiation on DNA structure in solution

O. M. Kotb^{a, b}, D. S. Brozhik^c, V. N. Verbenko^c, E. P. Gulevich^c, V. F. Ezhov^{a, c}, D. L. Karlin^c, F. A. Pak^c, S. V. Paston^{a, *}, A. I. Khalikov^c

^a St. Petersburg State University, St. Petersburg, 198504 Russia

^b Department of Physics, Faculty of Science, Zagazig University, Sharkia Gov Zagazig, Egypt

^c Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of NRC "Kurchatov Institute", Gatchina, 188300 Russia

*e-mail: s.v.paston@spbu.ru

We compared the damage in the DNA structure under the action of radiation with the same $LET = 0.3 \text{ KeV} \cdot \mu m^{-1}$: gamma radiation and protons with an energy of 1 GeV at absorbed doses of 0–100 Gy in solutions of 5 mM and 150 mM NaCl. It was found that proton irradiation causes a smaller drop in the melting temperature of DNA than gamma irradiation. Defects in the secondary structure of DNA are more significant in gamma-irradiated solutions. Signs of local multiple lesions are observed in DNA irradiated with protons. Thus, proton radiation is estimated to be more lethal for a cell than gamma radiation.