



Лаборатория клеточной и генной терапии ГАУЗ СО
«Институт медицинских клеточных технологий»

Макеев Олег Германович
Заведующий лабораторией,
заведующий кафедрой биологии Уральского государственного
медицинского университета
д.м.н., профессор

*Макеев О.Г., Коротков А.В., Сичкар Д.А.,
Мелехин В.В., Шуман Е.А., Сони́на О.А.*

КОРРЕКЦИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ УФ-ИЗЛУЧЕНИЕМ ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕНОМА КЛЕТОК

Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Российская Федерация
Уральский государственный медицинский университет,
Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Проведенное исследование продемонстрировало активацию репарационных систем клеток поверхностного слоя кожи и снижение генотоксических эффектов УФ-облучения при применении геля «AversGel»

Ключевые слова: УФ-излучение, репарация

Введение

Одной из значительных проблем дерматоонкологии является меланоматозное перерождение кожи, вследствие ультрафиолетового облучения естественного и/или искусственного происхождения. Последнее приводит к образованию злокачественных меланом, в том числе бесцветных, отличающихся высокой интенсивностью метастазирования и поздним началом лечения вследствие сложностей с выявлением первичного очага опухоли. Это обуславливает актуальность поиска средств, обладающих антимуtagenным воздействием на верхние слои кожи с одной стороны, а с другой — не препятствующие искомому косметологическому эффекту УФ-облучения — загару.

Цель исследования — разработка способа предотвращения негативного (мутагенного) воздействия УФ-излучения на генетический аппарат клеток поверхностного слоя кожи.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужили соскобы поверхностного слоя кожи от пяти испытуемых, полученные в ГАУЗ СО МКМЦ «Бонум». Забор соскобов проводился с трех участков кожи каждого пациента: 1 — с открытого участка тела, облученного ультрафиолетом (180-280 нм), с предварительной обработкой гелем «AversGel»; 2 — с открытого участка тела, облученного ультрафиолетом; 3 — контрольный образец с закрытой от воздействия ультрафиолета области тела.

Выделение ДНК из соскоба производилось по стандартной методике ДНК-сорбции на носителе Glassmilk (ДНК-Технология). Объем полученных образцов ДНК составлял 50 мкл (15 нг/мкл) для каждой пробы.

Для оценки действия УФ-излучения на генетический аппарат клеток и степени репаративной активности в клетках применялся метод анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась в модификации нашей лаборатории. Для постановки реакции использовались специфические праймеры и нуклеотиды (dCTP, dATP, метил-dTTP), меченые тритием. Полученный амплификат был разделен в процессе горизонтального агарозного гель-электрофореза в ТАЕ-буфере при 100В в течении 15 мин.

По окончании электрофореза гелевые пластины были разделены на дорожки, каждая из которых была разрезана на участки длиной 5 мм. Полученные фрагменты геля помещались во флаконы, содержащие 3.0 мл абсолютного изопропанола. Флаконы нагревали до 80°C в течении 2 часов. После экстракции из геля амплифицированных фрагментов, содержащих метку, во флаконы добавляли простой толуоловый сцинтиллятор (6,0 мл). Регистрация результатов производилась на автоматическом жидкостном сцинтилляционном счетчике «Бета-2».

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия в программном пакете Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Использованная методика позволяет количественно определить

степень фрагментации ДНК, то есть количественно оценить степень генотоксичности используемых повреждающих агентов и воздействие исследуемых препаратов. Особенностью технологии является то, что в отличие от фрагментированной («хвостовой») ДНК, нефрагментированная ядерная ДНК имеет крайне низкую степень миграции в агарозном геле, причем степень миграции прямо пропорциональна степени ее повреждения.

Как свидетельствует наш опыт, прямое сравнение между группами по активности включенной метки в ядерные и хвостовые части исследуемых образцов не всегда информативно. Поэтому нами используется значение соотношения ядерной и хвостовой частей в рамках одной группы – коэффициент фрагментации ДНК (Кфр) [1,2].

Результаты радиоактивности исследованных образцов представлены в таблице 1.

Исходя из представленных данных следует, что при воздействии УФ-излучения на кожу проявляется эффект поражения генетического аппарата клеток, проявляющийся увеличением коэффициента фрагментации ДНК по сравнению с интактными пробами контроля. Наряду с этим, предварительное применение геля сопровождается активацией репарационных систем клеток, что приводит к снижению коэффициента фрагментации и, тем самым, усилению элиминации повреждений.

Необходимо отметить, что только у одного из пяти пациентов (III) наблюдаемое снижение коэффициента фрагментации (при сочетании УФ-облучения и геля) по отношению ко второй пробе (воздействие УФ), так и не достигает показателя контроля и достоверно отличается от него. У остальных пациентов (I, II, IV, V) воздействие геля на фоне ультрафиолетового излучения обеспечивает восстановление фрагментации ДНК до контрольного значения.

Выводы

1. Предварительное исследование показало эффективность геля «AversGel» в отношении коррекции генотоксических эффектов УФ-облучения на клетки поверхностного слоя кожи.

2. Нанесение геля «AversGel», вероятно, сопровождается образованием активных метаболитов ПНЖК — эйкозаноидов, которые активируют репарационные системы клеток.

Таблица 1

Группа женщин		Активность ядра, в Бк/нг ДНК	Активность хвоста, в Бк/нг ДНК	Коэффициент фрагментации
I	УФ + гель	15687,05±425,26	7518,16±102,91	0,32*
	УФ	13227,56±386,39	9783,24±121,65	0,43
	Контроль	15961,77±458,46	7195,61±93,49	0,31*
II	УФ + гель	16237,42±501,30	7215,38±99,53	0,31*
	УФ	12418,47±318,11	10932,91±147,50	0,47
	Контроль	16506,16±538,28	6546,09±86,46	0,29*
III	УФ + гель	14711,23±412,96	8143,62±112,68	0,35**
	УФ	12878,54±334,12	10076,41±135,83	0,44
	Контроль	15843,83±452,64	7048,66±95,76	0,31***
IV	УФ + гель	15239,75±423,72	7840,08±105,88	0,34*
	УФ	13844,44±392,80	9119,38±119,59	0,40
	Контроль	14869,19±423,81	8156,77±113,44	0,35*
V	УФ + гель	15839,51±451,37	7325,06±100,28	0,32*
	УФ	12147,23±307,69	10949,33±149,72	0,47
	Контроль	15264,83±425,12	7918,59±105,37	0,34*

* — достоверность отличий показателя ($p \leq 0,05$) по отношению к показателю второго образца.

** — достоверность отличий показателя ($p \leq 0,05$) по отношению к показателю второго и третьего образца.

*** — достоверность отличий показателя ($p \leq 0,05$) по отношению к показателю первого и второго образца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кацнельсон Б.А., Макеев О.Г., Дегтярёва Т.Д. Экспериментальное испытание комплекса средств биологической защиты организма от канцерогенного действия комбинации экотоксикантов. [Текст]/ Б.А. Кацнельсон, О.Г. Макеев, Т.Д. Дегтярёва, Л.И. Привалова, В.А. Буханцев, С.А. Денисенко, Т.В. Слышкина, Н.П. Макаренко, И.Х. Измайлов, Е.С. Куликов// Токсикологический вестник. - Москва, №3, 2007. С. 15-20

2. Минин В.В., Буханцев В.А., Довженко Е.И. Обоснование применения комплекса средств для биологической профилактики в городах с повышенным риском развития рака [Текст]/ Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения: Материалы 62-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием - Екатеринбург: Изд-во УГМА, 2007.