Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»
Федерального медико-биологического агентства России

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля
Российской академии наук

На правах рукописи

Грехова Анна Константиновна

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА, ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ И СРЕДНИХ ДОЗАХ

03.01.01 – Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор РАН
Осипов Андреян Николаевич

Москва - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 12

1.1. Белок γH2AX - маркер двунитевых разрывов ДНК 13

1.1.1. Характеристика белка γH2AX 13

1.1.2. Природа спонтанных (фоновых) фокусов γH2AX 14

1.2. Образование γH2AX при радиационном воздействии 16

1.3. Роль фосфорилирования гистона H2AX в репарации двунитевых разрывов ДНК 19

1.3.1. Характеристика киназ, фосфорилирующих H2AX 19

1.3.1.1. Вклад киназ в фосфорилирование H2AX 19

1.3.1.2. Особенности пострадиационной активации киназ, фосфорилирующих H2AX 21

1.3.2. Основные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК 23

1.3.3. Влияние структуры хроматина на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX 26

1.3.4. Влияние фаз клеточного цикла на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX 28

1.4. Возможные причины длительного поддержания «остаточных» радиационно-индуцированных фокусов γH2AX 29

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 34

2.1. Культура клеток 34

2.1.1. Выделение фибробластов из биоптата кожи в заушной области 34

2.1.2. Подготовка культуры фибробластов к экспериментам 35

2.2. Облучение культуры фибробластов 36

2.3. Проведение иммуноцитохимического анализа 36

2.3.1. Фиксация препаратов 36

2.3.2. Окрашивание препаратов 37

2.3.3. Микроскопия 39

2.3.4. Математический анализ данных 40

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 42

3.1. Изменения количества фокусов γH2AX в фибробластах человека после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр 42

3.2. Пострадиационное восстановление структуры ДНК от двунитевых разрывов 48

3.2.1. Оценка изменения количества фокусов γH2AX в фибробластах человека после облучения в дозах 20-1000 мГр 48

3.2.2. Изменения количества и размера фокусов γH2AX и фокусов фосфорилированного белка ATM (pATM) 52

3.2.2.1. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на количество фокусов pATM и их солокализацию с фокусами γH2AX…….. 52

3.2.2.2. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на размер фокусов γH2AX и pATM 58

3.2.3. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на количество фокусов Rad51 60

3.3. «Остаточные» фокусы γH2AX, pATM и Rad51 через 24 ч после облучения фибробластов. 69

3.3.1. «Остаточные» фокусы γH2AX 69

3.3.2. «Остаточные» фокусы pATM 70

3.3.3. «Остаточные» фокусы Rad51 71

3.4. Влияние пролиферативной активности клеток на эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК 72

3.4.1. Влияние пролиферативной активности фибробластов на изменение количества радиационно-индуцированных фокусов γH2AX 73

3.4.2. Влияние малой и средних доз ионизирующего излучения на изменение через 24 ч процентного соотношения клеток в разных фазах клеточного цикла 78

3.4.3. Влияние пролиферативной активности фибробластов на изменение количества радиационно-индуцированных фокусов pATM 80

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 82

ВЫВОДЫ 86

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 87

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 90

ПРИЛОЖЕНИЕ А 109

БЛАГОДАРНОСТЬ 111

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время довольно хорошо изучены последствия, вызываемые облучением в больших дозах (свыше 1000 мГр): морфофункциональные изменения, лучевая болезнь, которая в тяжелом варианте завершается летальным исходом, канцерогенез, старение. Однако, по-прежнему, отсутствует единая точка зрения о биологических эффектах, вызываемых облучением в малых (от 10 до 100 мГр) дозах. С одной стороны, среди полезных, положительных эффектов облучения в малых дозах называют радиационный гормезис [1] и феномен адаптивного ответа [2, 3]. С другой стороны, существуют эпидемиологические данные, свидетельствующие об увеличении риска возникновения онкологических заболеваний (стохастические эффекты) после воздействия острого облучения в дозах выше 50 мГр или хронического в дозе 100 мГр [4], а также медицинских диагностических процедур, в частности, компьютерной томографии [5]. В этой связи, изучение биологических эффектов действия малых доз ионизирующего излучения (ИИ) становится особенно актуальным, поскольку использование ионизирующей радиации в медицинских целях составляет около 95% [6].

На молекулярном уровне одной из основных мишений ИИ является информационная макромолекула - ДНК. Ионизирующее излучение вызывает разнообразные повреждения ДНК: модификации оснований, однонитевые и двунитевые разрывы, апуриновые и апиримидиновые сайты (АП-сайты), ДНК-белковые сшивки, сшивки ДНК-ДНК и др. [7]. Среди этих повреждений двунитевые разрывы (ДР) ДНК являются наиболее критическими для дальнейшей судьбы клетки. Именно они запускают процессы клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения [8]. Изучение механизмов возникновения и репарации этих повреждений остается актуальной проблемой.

Противоречивость экспериментальных данных и сопутствующих суждений о биологической значимости воздействия ИИ в малых дозах явились поводом к проведению нами сравнительных исследований ДР ДНК, индуцированных редкоионизирующим излучением в дозах малого и среднего диапазонов.

Степень разработанности темы

Большое число исследований посвящено изучению закономерностей индукции ДР и их репарации при использовании ИИ в больших дозах [9-11] Известно, что выводы об опасности облучения в малых дозах формировались за счет экстраполяции эффектов, полученных в результате воздействия больших доз, поскольку отсутствовали чувствительные методы регистрации эффектов, вызываемых ИИ в малых дозах.

В последние десятилетия стали активно развиваться высокочувствительные методы косвенной оценки изменений количества ДР в живых клетках, основанные на иммуноцитохимическом анализе белков, участвующих в репарации ДР ДНК [12]. Образующиеся во время репарации ДНК от ДР сложные динамические микроструктуры, состоящие из тысяч копий белков, визуализируются после иммуноцитохимического окрашивания в виде ярких точек, из-за чего получили в литературе название фокусов белков репарации. Количественный и качественный анализ фокусов белков репарации в настоящее время считается самым чувствительным методом анализа повреждений ДНК и широко используется для изучения закономерностей индукции и репарации ДР ДНК. Анализ изменения количества фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γH2AX) в качестве биологического маркера ДР ДНК нашел широкое применение в различных биологических исследованиях, в частности, в радиационной биодозиметрии [13] и оценке индивидуальной радиочувствительности [14]. Иммуноцитохимический метод анализа фокусов белков репарации позволяет детектировать увеличение количества

ДР ДНК при малых и средних дозах облучения, а также определять расположение белков репарации относительно ДР ДНК в ядре клетки.

Цели и задачи

Цель работы состояла в изучении закономерностей образования и репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных рентгеновским излучением в малых и средних дозах в фибробластах кожи человека *in vitro*. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить зависимость между дозой рентгеновского облучения и количеством фокусов белков репарации γH2AX и pATM в интервале доз 20-1000 мГр.
2. Сравнить динамику изменений количества фокусов белков репарации γH2AX, pATM и Rad51в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в малых и средних дозах.
3. Оценить влияние пролиферативной активности и фазы клеточного цикла на возникновение и деградацию фокусов белков репарации.
4. Определить вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после облучения в малых и средних дозах.

Научная новизна

– Впервые на несинхронизированной популяции фибробластов кожи человека путем детального (по минутам и часам в течение первых суток) изучения кинетики возникновения и репарации двунитевых разрывов ДНК установлено, что абсолютное и относительное количество фокусов γH2AX, pATM и Rad51 через 24 ч в клетках, облученных в дозах малого (20 – 80 мГр) диапазона было выше, чем после воздействия ИИ в средних дозах (160 – 1000 мГр).
– Увеличение количества фокусов белков репарации через 24 ч после облучения клеток в дозах малого диапазона связано с образованием их *de novo* в результате стимуляции пролиферативной активности

фибробластов. Полученные результаты опровергают гипотезы о неэффективной, а также индуцибельной репарации ДНК после облучения в малых дозах.

– Впервые показано, что репарация двунитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением в малых дозах, происходит более «корректно», чем после облучения в средних дозах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты анализа пострадиационных изменений количества фокусов белков репарации с расчетом вклада гомологичной рекомбинации чрезвычайно важны для оценки эффективности репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК, а также индивидуальной радиочувствительности.

При изучении закономерностей индукции и репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК в несинхронизированной клеточной популяции необходимо учитывать разнонаправленное - стимулирующее (для малых доз) или ингибирующее (для средних доз) действие ИИ в пролиферирующих клетках. Увеличение количества фокусов γH2AX, регистрируемых через длительное время после облучения (24 ч) за счет их образования *de novo* в результате клеточной пролиферации, может приводить к ошибочному заключению о повышенном риске при облучении в малых дозах, что может свидетельствовать о более эффективной репарации ДР ДНК после облучения в малых дозах и о возможном отсутствии негативных эффектов в результате данного воздействия. Это особенно важно при оценке воздействия ИИ в малых дозах во время проведения диагностических радиологических процедур (компьютерная томография, магниторезонансная томография, рентгенологические исследования).

Фокусы фосфорилированного корового гистона H2AX рекомендуются нами в диапазоне доз от 20-1000 мГр в качестве возможного радиационного биологического маркера для определения поглощенной дозы, поскольку

установлена линейная зависимость между количеством фокусов γH2AX и дозой рентгеновского излучения.

Результаты работы могут быть использованы при чтении лекционных курсов в ВУЗах по программам «Радиобиология», «Биофизика».

Методология и методы исследования

В работе использованы современные методы исследований. Оценку индукции и репарации ДР ДНК проводили с использованием иммуноцитохимического окрашивания клеток при помощи антител, специфичных к белкам, участвующим в процессах репарации ДР. Для идентификации ДР ДНК, индуцированных ИИ, использовали антитела к фосфорилированному по серину-139 гистону H2AX. Для анализа фокусов активного/фосфорилированного ATM (pATM) использовали первичные антитела к pATM. ATM является основной киназой, фосфорилирующей гистон H2AX в областях хроматина, прилегающих к ДР, индуцированных ионизирующим излучением. Для анализа фокусов ключевого белка гомологичной рекомбинации использовали первичные антитела к белку Rad51. Анализ клеточной пролиферации и клеток в S/G2 фазах проводили с использованием антител к белкам Ki67 и CENPF, соответственно. Белок Ki67 является маркером клеточной пролиферации (присутствует в клеточном ядре в делящихся клетках в фазах G1, S, G2, M и отсутствует в покоящихся – в фазе G0). Белок CENPF является маркером клеток в S/G2 фазах.

Статистические расчеты проведены с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (Statsoft, США). Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Расчет относительного вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК был выполнен методом трапеций.

Экспериментальная работа была выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный

центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Положения, выносимые на защиту

1. Стимуляция пролиферативной активности клеток облучением в малой дозе существенно влияет на количество фокусов белков репарации (γH2AX, pATM) в несинхронизированной клеточной популяции**.**
2. Повышенный уровень фокусов белков репарации через 24 ч после облучения несинхронизированной популяции фибробластов в дозах малого диапазона связан с образованием их *de novo*.
3. Вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК в первые сутки после облучения фибробластов в дозах малого диапазона был выше, чем после воздействия рентгеновского излучения в дозах среднего диапазона.

Степень достоверности и апробация результатов

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций (из них 1 статья в зарубежном журнале) и 7 тезисов докладов.

Материалы диссертации были представлены на Третьей Международной конференции по радиации и ее применению в различных областях исследований RAD 2015 (Будва, Черногория, 2015), Научной сессии НИЯУ МИФИ-2015 (Москва, 2015), XX ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва, 2015), 42-й Конференции Европейского общества радиационных исследований (Амстердам, Нидерланды, 2016), Международном научно-

практическом форуме «Ядерные технологии на страже здоровья» (Москва, 2016), XXIII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва, 2018), Школе-конференции молодых ученых с международным участием «Ильинские чтения» (Москва, 2018).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 18-34-00003.

Личный вклад автора

Личный вклад диссертанта заключался в планировании и проведении научных экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, а также подготовке статей к опубликованию. Все исследования проводились автором лично. Материалы диссертации доложены автором в виде устных докладов на конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 111 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 147 источников (из них 133 на иностранном языке) и приложения. Работа иллюстрирована 29 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В 1953 году в журнале «Nature» опубликовано фундаментальное открытие Ф. Крика и Д. Уотсона о структуре дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), являющейся носителем наследственного кода клетки [15, 16]. Стало известно, что ДНК состоит из двух равнозначных цепей. Такая структура обеспечивает резерв надежности, так как в случае поломки (разрыва одной из цепей) вторая используется как матрица для восстановления целостности с соблюдением точной последовательности азотистых оснований.

Несопоставимо сложнее развиваются процессы репарации в случае разрыва обеих цепей ДНК, которые могут возникать в результате воздействия различных эндогенных и экзогенных факторов (радиационное воздействие, химические соединения и др.). На пути изучения этих процессов основной методической трудностью становится поиск надежного метода определения двунитевых разрывов (ДР) ДНК. С 1973 года были предложены различные способы определения ДР ДНК: метод гель-фильтрации [17], метод седиментации или ультрацентрифугирование в нейтральном градиенте сахарозы [18], метод пульс-гель-электрофореза [19], метод электрофореза ДНК единичных клеток или метод ДНК-комет [20], иммуноцитохимический метод [21].

В настоящее время иммуноцитохимический метод является наиболее чувствительным и часто используемым методом исследования повреждений ДНК. Он позволяет проводить не только количественную оценку ДР ДНК, но и определять локализацию ДР ДНК и белков репарации в ядре клетки. Благодаря этим преимуществам иммуноцитохимический метод был выбран для проведения данного исследования.

1.1. Белок γH2AX - маркер двунитевых разрывов ДНК

1.1.1. Характеристика белка γH2AX

В 1998 году было опубликовано сообщение Rogakou E.P. et al. о том, что в клетках в первую минуту после воздействия рентгеновского излучения на месте образования ДР появляются фосфорилированные формы корового гистона H2AX [22].

H2AX является членом семейства гистонов H2A, одного из пяти семейств гистонов, которые участвуют в упаковке и организации ДНК в хроматине.

Как и многие клеточные белки, гистон H2AX подвергается ряду химических реакций. Он может быть ацетилирован по лизину-5 [23, 24]; биотинилирован по лизину-9 и -13 [25]; убиквитилирован по лизину-119 [24] и фосфорилирован по серину-1[23] и -139 [22], а также по тирозину-142 [26].

При этом отмечено, что лишь некоторые реакции имеют значение при образовании двунитевых разрывов ДНК [27]. К примеру, в обычных условиях (без воздействия повреждающих факторов) фосфорилирование H2AX происходит по тирозину- 142, а при появлении ДР ДНК моментально запускается его дефосфорилирование, которое в свою очередь, является предпосылкой для фосфорилирования H2AX по серину-139. Когда происходит фосфорилирование H2AX по тирозину-142, сродство серина-139 к факторам ответа на повреждение ДНК (MDC1, MRE11 и Rad50) значительно снижается и происходит связывание с проапоптотическим фактором JNK1. В этой связи было высказано предположение, что статус фосфорилирования по тирозину-142 является определяющим фактором судьбы клетки после повреждения ДНК [26].

Кроме того, убиквитилирование H2AX по лизину-119 с его предшествующим ацетилированием по лизину-5 способствуют высвобождению H2AX из хроматина под действием комплекса Tip60 и UBC13 после образования ДР ДНК, вызванных ионизирующим излучением,

в результате чего, изменяется структура хроматина, и ДР становятся более доступными для белков репарации [24].

Центральным звеном многочисленных сигнальных путей, активируемых в ответ на ДР ДНК, является фосфорилирование гистона H2AX по серину-139 (γH2AX). Присоединение фосфата происходит к кислороду серина в гамма-положении, поэтому модифицированная форма широко упоминается как γH2AX. Обнаружено, что H2AX фосфорилируется в течение 20 секунд с момента образования ДР ДНК на расстояние до 2 Мб от места повреждения [22] и после иммуноцитохимического окрашивания проявляется в виде ярких точек, вследствие чего они получили название фокусов белков репарации. В настоящее время признано, что каждый фокус γH2AX состоит из приблизительно 2000 молекул H2AX [28] и представляет собой сайт репарации одиночных или множественных ДР ДНК [29].

Изложенное представление о взаимосвязи ДР ДНК и последующего формирования фокусов белков репарации послужило основанием для нашего выбора γH2AX в качестве маркера ДР ДНК.

1.1.2. Природа спонтанных (фоновых) фокусов γH2AX

В клетках всегда присутствует фоновый уровень фокусов фосфорилированного гистона H2AX. Для каждого вида и линии клеток уровень спонтанных фокусов γH2AX является в определенной мере стационарной характеристикой [30, 31]. Так, уровень спонтанных фокусов γH2AX в ядрах фибробластов человека меняется в пределах от 0,2 до 2,6 фокусов/ядро [32]. В работе Rothkamm K. и Lobrich M. (2003) установлено более низкое значение спонтанных фокусов в нескольких линиях фибробластов человека (0,05 фокусов/ядро) [29]. Поскольку фокус γH2AX маркирует двунитевой разрыв в ДНК, то объяснением существенного различия (в 5-50 раз) в количестве фоновых фокусов γH2AX можно считать ферментативные ДР (коллапс репликативной вилки в S-фазе клеточного цикла). Еще одной причиной возрастания числа фокусов γH2AX могут быть

повреждения ДНК на концевых участках хромосом или теломерах в процессе старения клеток [33]. Так, в результате многих циклов деления, когда клетка проходит через S-фазу, теломерная ДНК становится короче на 100-150 нуклеотидов, поскольку во время репликации ДНК невозможно точное копирование концов теломерной ДНК, в результате, остаются очень короткие теломеры, которые не могут эффективно защищать концы хромосомальной ДНК. Так, Herbig U. et al. (2006) было показано, что более 80% стареющих фибробластов бабуина имели фокусы γH2AX, индуцированные дисфункцией теломер [34]. Кроме того, для каждой линии клеток, характерно определенное количество повреждений ДНК, ассоциированных с теломерами [35].

Важно отметить, что значение фонового уровня фокусов γH2AX не зависит от доли белка H2AX в пуле гистона H2A, включающего все его варианты (H2A1, H2A2, H2A-Bbd, H2AX и H2AZ), в составе нуклеосом. По данным Rogakou E.P. et al. (1998) в нормальных фибробластах человека около 10% H2AX присутствует в пуле гистона H2A, 2% H2AX от общего количества H2A в лимфоцитах и HeLa клетках и до 25% в опухолевой клеточной линии глиомы человека (SF268) [22]. В то же время в работе Markova E. et al. (2007) было установлено, что в опухолевых клетках линии HeLa количество спонтанных фокусов γH2AX и другого маркера ДР ДНК - 53BP1 значительно выше, чем в клетках нормальных фибробластов линии VH-10 [36].

Возможным источником γH2AX могут являться и апоптотические клетки с фрагментированной ДНК [37]. В этих клетках фосфорилирование H2AX в первые часы является диффузным из-за случайного включения H2AX в нуклеосомы, а позднее формируется кольцевое окрашивание или апоптотическое кольцо γH2AX на периферии ядра [38], которое солокализуется с поврежденными концами ДНК [39].

Наибольшее влияние на фоновый уровень фокусов γH2AX в клеточной популяции, по данным MacPhail S.H. et al. (2003), оказывает

пролиферативная активность [30]. Costes S. et al. (2006) подтвердили этот феномен на фибробластах человека линии HCA2 и показали, что около 11% ядер необлученных (контрольных) клеток содержат спонтанные фокусы γH2AX, причем из них доля пролиферирующих клеток составляла 9,2%, а непролиферирующих - 1,5%. Кроме того, были выявлены качественные (по размерам) и количественные различия в образовании спонтанных фокусов γH2AX. Пролиферирующие клетки содержали мелкие фокусы γH2AX и их количество колебалось в пределах от 1 до 69 в ядре. В непролиферирующих клетках наблюдались крупные фокусы γH2AX и их количество было весьма незначительно - от 1 до 4 в ядре [40]. Годом ранее на большом количестве клеточных линий McManus K. и Hendzel M. (2005) установили, что крупные фокусы фосфорилированного белка H2AX проявляют существенную солокализацию с репарационными белками, в то время как, солокализация между мелкими фокусами γH2AX и белками репарации практически отсутствовала [41]. Выявленная McManus K. и Hendzel M. (2005) закономерность хорошо согласовывалась с ранее опубликованной работой Rogakou E.P. et al (1999) в том, что мелкие фокусы γH2AX присущи митотическим клеткам из-за большего уплотнения в них хроматина, препятствующего транспорту ферментов к репарируемым повреждениям-мишеням в ДНК [28].

Анализ ряда работ, продемонстрировавших вариабельность фоновых фокусов γH2AX, оказался полезным при планировании собственных экспериментов, так как выявил значимость адекватного контроля и учета состояния клеточного материала.

1.2. Образование γH2AX при радиационном воздействии

В ответ на образование ДР ДНК, в результате воздействия ионизирующего излучения на клетки, происходит образование сложных микроскопически видимых комплексов белков, участвующих в репарации ДНК, то есть радиационно-индуцированных фокусов (РИФ). Эти фокусы

представляют собой скопления белков, которые образуются в области ДР ДНК в течение первой минуты после воздействия ионизирующего излучения. Rogakou E.P. et al. (1998) удалось зарегистрировать индукцию γH2AX уже через 20 сек после γ-облучения клеток яичников китайского хомячка (линии CHO) в дозе 200 Гр. Причем половина от максимальных значений достигалась за первую минуту, а максимум регистрировали к 10-й мин. Этот максимум γH2AX сохранялся 30 мин, а затем в течение нескольких часов происходило уменьшение количества γH2AX до контрольных значений [22]. Близкие результаты получены Rogakou E. P. et al. (1999) на нормальных фибробластах кожи индийского мунтжака (Muntiacus muntjak). Через 1 мин после воздействия γ- излучения в дозе 600 мГр появлялись мелкие фокусы γH2AX. Через 9 мин после облучения они становились более яркими и крупными, и достигали максимальной яркости и размера через 30 мин после облучения [28]. Эти данные свидетельствуют о том, что в начале фосфорилируются молекулы H2AX вблизи участка ДР ДНК, а позднее включаются молекулы на более удаленных расстояниях от места повреждения ДНК.

В работе Lobrich M. et al. (2010) было отмечено, что максимальное число фокусов γH2AX формируется через 3 мин после воздействия ИИ, но подсчет затруднен в это время из-за их малых размеров [42].

Costes S.V. et al. (2006) установили, что размеры и количество радиационно-индуцированных фокусов различаются в зависимости от дозы и продолжительности облучения, а также исследуемого белка. После облучения фибробластов человека линии HCA2 в дозе, равной или превышающей 300 мГр, не удалось обнаружить изменений в размере РИФ в течение 2-х часов. Резкое увеличение размера РИФ по сравнению с контролем регистрировалось после снижения дозы до 100 мГр [40].

В связи с этим возникает вопрос о форме зависимости количества РИФ γH2AX от дозы облучения. В настоящее время принято считать линейной зависимость количества фокусов γH2AX от дозы ИИ. В 2003 году

Rothkamm K. и Lobrich M., пользуясь иммуноцитохимическим методом, установили линейную зависимость числа фокусов γH2AX при дозах облучения от 1 до 2000 мГр [29]. Прямую зависимость количества фокусов γH2AX от дозы облучения в диапазоне 10-3000 мГр обнаружили Costes S.V. et al. [40], а позднее Asaithamby A. и Chen D. J. (2009) подтвердили для диапазона 5-1000 мГр [43]. В 2006 году Mahrhofer H. et al. также отметили линейную закономерность количества фокусов γH2AX от дозы облучения на 10-ти нормальных и опухолевых клеточных линиях, применив большие дозы (1000–4000 мГр) [44]. Прямая зависимость количества фокусов от дозы ИИ в диапазоне 10-5000 мГр была установлена также и для другого белка- маркера ДР ДНК 53BP1 в исследовании Markova E. et al (2007) [36].

Вместе с тем появились исследования, в которых не подтверждается линейная зависимость между дозой облучения и образованием РИФ γH2AX. В исследовании зависимости «доза-эффект» образования фокусов 53BP1 было показано, что количество радиационно-индуцированных фокусов не пропорционально дозе облучения [45]. Так, выход фокусов при облучении в дозах 100 мГр и 1000 мГр составил 73 фокус/клетка/Гр и 28 фокус/клетка/Гр, соответственно. Повышенный уровень фокусов белка 53BP1 при облучении в малых дозах может быть обусловлен тем, что при небольшом количестве ДР даже незначительный вклад дополнительных ДР образующихся, например, при коллапсе репликативных вилок оксидативными повреждениями ДНК [46], является значимым для расчета относительного выхода фокусов.

Принимая во внимания два различающихся варианта зависимости количества РИФ γH2AX от дозы облучения, в задачу нашего исследования входило выявление вида зависимости между ними применительно к нашим условиям эксперимента.

1.3. Роль фосфорилирования гистона H2AX в репарации двунитевых разрывов ДНК

1.3.1. Характеристика киназ, фосфорилирующих H2AX

1.3.1.1. Вклад киназ в фосфорилирование H2AX

Установлено, что процесс репарации ДР ДНК начинается с реакции фосфорилирования гистона H2AX, роль которого заключается в привлечении белков репарации к месту разрыва ДНК, и зависит от активности киназ семейства фосфатидилинозитол-3-киназ-протеинкиназы, а именно, ataxia telangiectasia mutated (ATM) (продукт гена, связанного с наследственным синдромом атаксии-телеангиэктазии), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) (ATM- и Rad3-родственная киназа), а также ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) [47].

Существует несколько представлений об участии киназ в репарации ДР ДНК. В 2000 году в работе Paull T.T. et al., выполненной на клетках, подвергнутых рентгеновскому облучению, была показана прямая зависимость между низким уровнем ATM и существенным снижением выхода фокусов γH2AX [48]. Через год результаты, полученные в исследованиях Burma S. et al. (2001), позволили однозначно определить ATM как одну из основных киназ, участвующих в фосфорилировании H2AX. Авторы предположили, что она является одной из самых ранних киназ, которая активируется в ответе клетки на образование ДР ДНК. В случаях отсутствия ATM некоторое количество гистона H2AX фосфорилируется ДНК-ПК [49]. Процесс фосфорилирования гистона H2AX в хроматине иллюстрирует рисунок 1 на основе данных работы Stucki M. et al. [50]. В 2005 году Peng Y. et al. показали, что дефицит в клетках ДНК-ПК проявляется снижением активности ATM, что в свою очередь сказывается на уменьшении фосфорилирования H2AX [51]. Этот феномен был подтвержден позднее в исследованиях Shrivastav M. et al. (2009) [52].

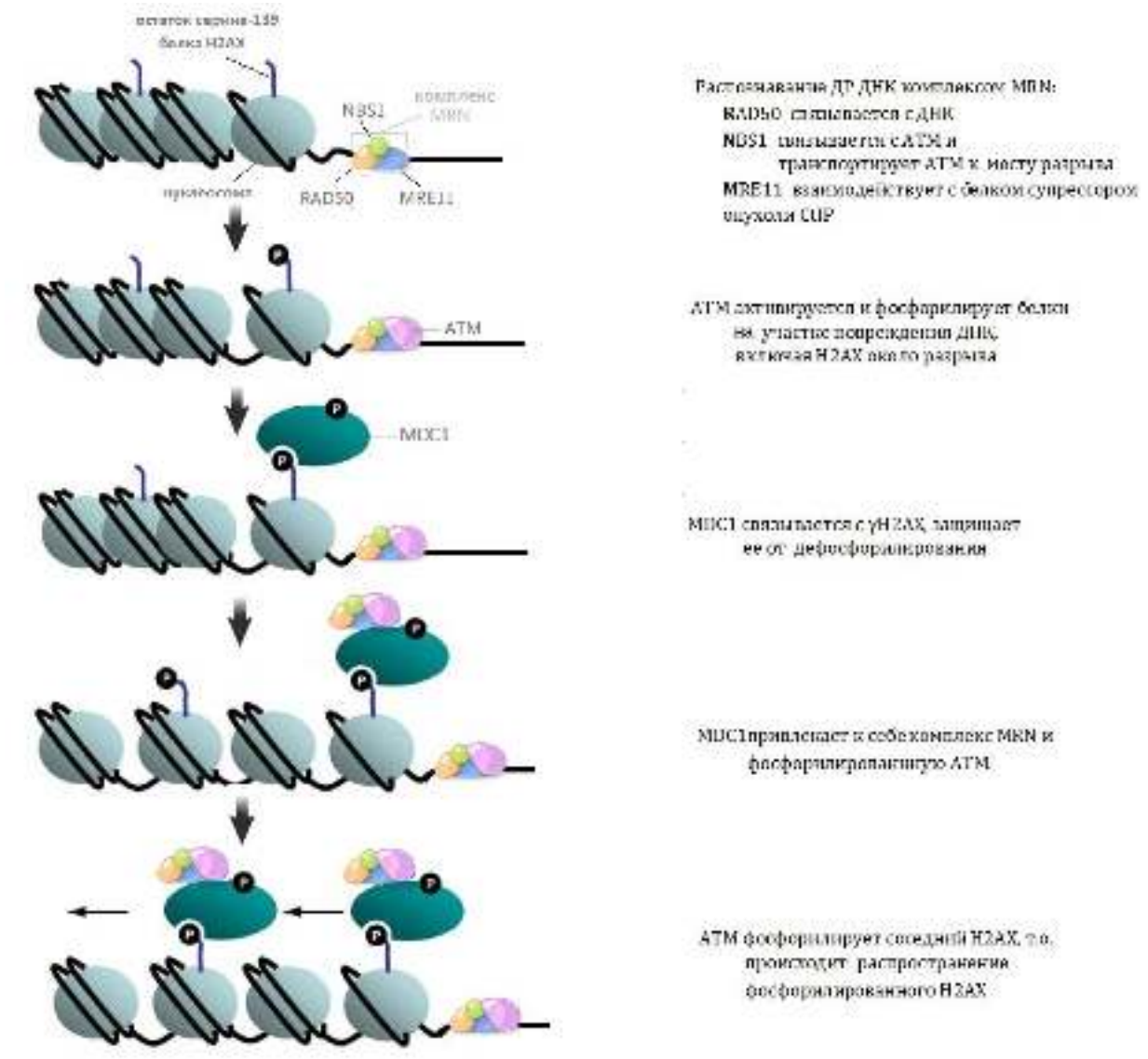


Рисунок 1. Схема фосфорилирования H2AX.

MRN – Mre11-Rad50-Nbs1- репаративный комплекс, осуществляющий репарацию ДР ДНК

NBS1 – белок, кодируемый геном NBS, мутация в этом гене ассоциирована с наследственным заболеванием **N**ijmegen **B**reakage **S**yndrome (синдром хромосомной неустойчивости Неймегена)

Rad50 – белок, принимающий участие в рекомбинации и рекомбинационной репарации гомологичных ДНК

MRE11 - белок, участвующий в гомологичной рекомбинации, поддержании длины теломер и репарации ДР ДНК

MDC1 – белок, привлекающий в область ДР ДНК белки репарации

Результаты, полученные An J. et al. (2010) также свидетельствуют о том, что ДНК-ПК играет не менее важную роль, чем ATM в фосфорилировании H2AX. Обе киназы функционально дополняют друг друга во время фосфорилирования H2AX в ответ на повреждение ДНК, вызванное ИИ [53]. Так, в работе Flassig R.J. et al. отмечено, что фосфорилирование гистона H2AX происходит в две фазы: вначале под действием киназы ДНК-ПК, а позднее при участии ATM. Такое двухфазное фосфорилирование H2AX способствует поддержанию сигнала о наличии повреждения ДНК для надежного его обнаружения [54].

Участие киназы ATR в образовании γH2AX установлено Ward I.M. и Chen J. (2001) при возникновении двойных разрывов нити ДНК в результате коллапса репликативных вилок [55]. Следует отметить, что при репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК вслед за активацией ATM и образованием одноцепочечной ДНК запускается активация ATR [56].

1.3.1.2. Особенности пострадиационной активации киназ, фосфорилирующих H2AX

В опубликованных исследованиях называются разные сроки появления фосфорилированного белка H2AX и его максимального проявления, при этом активность киназ играет решающую роль в фосфорилировании H2AX. Так, в исследованиях An J. et al. (2010), использовавших для облучения дозу 4 Гр, увеличение автофосфорилирования ДНК-ПК, а также фосфорилирование белка H2AX регистрировали в первые 15-60 мин после образования ДР ДНК [53]. По данным Abramenkovs A. и Stenerlöw B. (2017) оценка изменения количества фосфорилированной ДНК-ПК дает лучшее представление о репарации ДР ДНК в первые 30 мин после индукции повреждения, чем анализ фокусов γH2AX [57]. В плане оценки значимости киназ интересно сообщение Suzuki K. et al. (2006), которые отметили, что фокусы фосфорилированной киназы ATM (pATM) являются лучшим биологическим маркером радиационно-

индуцированных ДР ДНК, чем фокусы γH2AX особенно при воздействии ИИ в диапазоне малых доз (до 100 мГр) [58]. Преимуществом ATM-киназы является также ее солокализация с фосфорилированной формой гистона H2AX. Результаты солокализации согласуются с основной ролью ATM в раннем распознавании ДР ДНК. Так, в исследованиях Bakkenist C.J. и Kastan M.B. (2003) зарегистрирован максимальный уровень pATM через 5 мин после воздействия ИИ в дозе 0,5 Гр [59]. Kitagawa R. и Kastan M.B. (2005), продолжив исследование, уточнили, что при дозе облучения 0,5 Гр в клетке фосфорилируется более 50% ATM быстрее, чем за 5 мин [60]. В исследовании Yamauchi M. et al. на нормальных диплоидных клетках человека линии HE49 было обнаружено много мелких фокусов pATM (36,9 фокус/клетка) через 15 мин после облучения в дозе 1 Гр. Их количество уменьшилось до контрольных значений через 24 ч [61]. Используя несинхронизированные клетки человека, подвергнутые облучению в дозах широкого диапазона (0,1 - 1 Гр), Suzuki K. et al. (2006) регистрировали через 30 мин максимальное число фокусов pATM (50 фокус/клетка/Гр) при фоновом количестве 0,2 фокуса на клетку [58]. Если в качестве модели исследования использовали фибробласты кожи линии GM38, а регистрацию результатов проводили с использованием проточной цитометрии, то максимум pATM выявлялся через 2 ч при дозе облучения 0,5 Гр [62].

Итак, с помощью киназ ATM и ДНК-ПК происходит быстрое фосфорилирование H2AX в ответ на образовавшиеся радиационно-индуцированные ДР ДНК.

Из приведенных литературных данных следует, что время возникновения первых проявлений фосфорилирования киназ ATM и ДНК-ПК, а еще в большей степени сроки их максимального фосфорилирования заметно различались и зависели от дозы ИИ, типа и линии используемых клеток, а также метода регистрации. В связи с этим выводом представлялось необходимым провести в работе определение основных

параметров фосфорилирования киназ, применительно к условиям наших экспериментов.

1.3.2. Основные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК

Известно, что репарация ДР ДНК осуществляется по двум механизмам: негомологичное соединение концов (НГСК) и гомологичной рекомбинации (ГР), которые могут существовать в двух вариантах. В случае НГСК по классическому пути (рисунок 2) гетеродимер Ku70/80 связывает концы разрыва, привлекая к нему ДНК-ПК с ее автофосфорилированием [63].

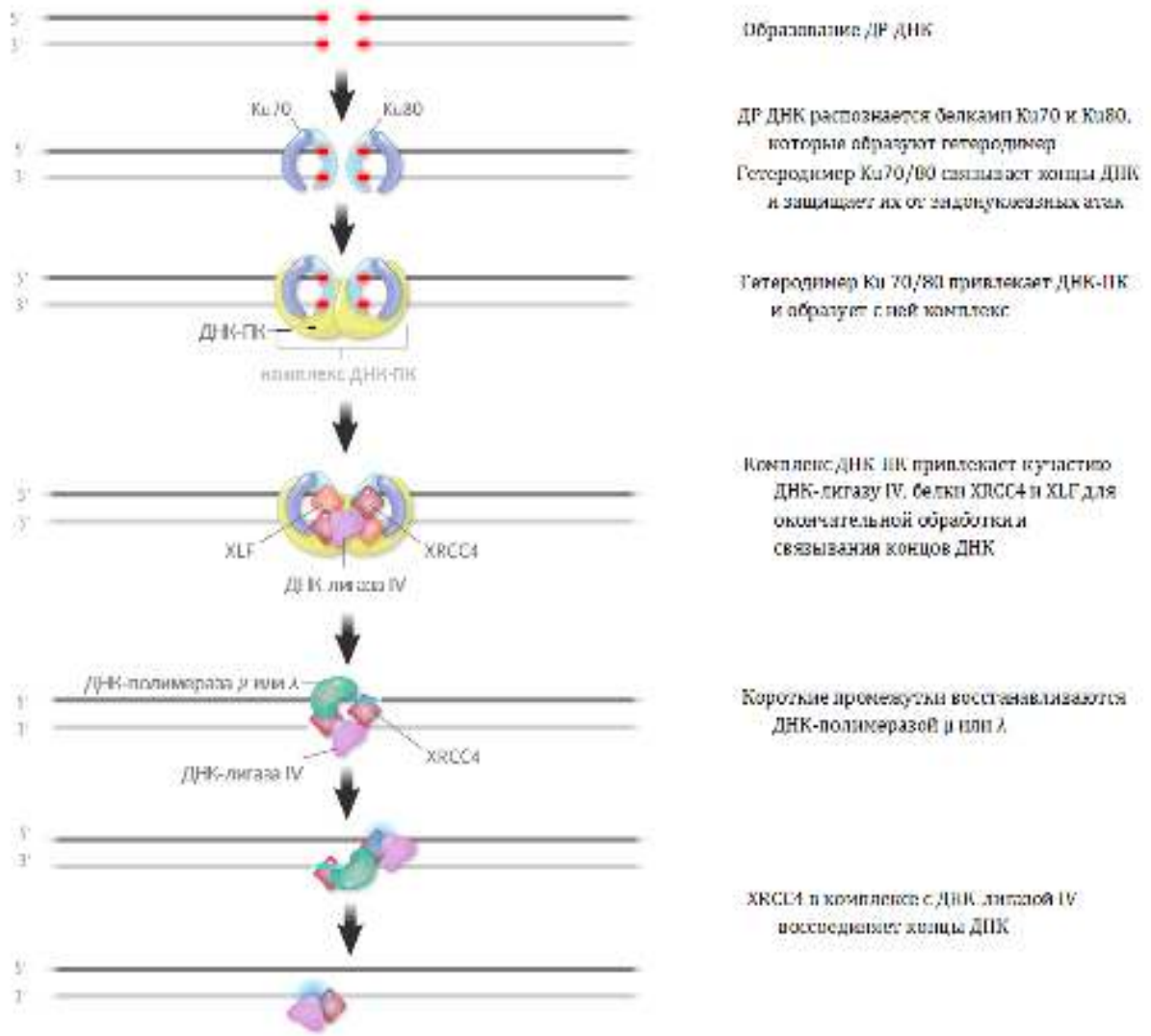


Рисунок 2. Репарация двунитевых разрывов ДНК по пути негомологичного соединения концов.

При отсутствии белков Ku или лигазы IV репарация ДНК от ДР происходит по альтернативному пути с участием белков PARP-1, лигазы I и III, а также XRCC1 [64, 65].

Во время ГР по основному пути (DSBR-путь) на месте повреждения ДНК появляется комплекс MRN (состоящий из белков MRE11, RAD50 и NBS1), который конкурирует с гетородимером Ku70/80, связываясь с ДНК [66]. При участии комплекса MRN происходит автофосфорилирование ATM по остатку серина-1981 с последующим фосфорилированием гистона H2AX [67] (рисунок 3). Гомологичная рекомбинация путем синтез-зависимого отжига цепей (SDSA -путь) до образования D-петли и структуры Холлидея также идет по основному пути ГР, в результате чего ДНК-полимераза восстанавливает внедренную цепь ДНК комплементарно матричной цепи. Далее вновь синтезированная цепь ДНК смещается обратно и синтезируется остальная часть поврежденной ДНК [68]. Важно отметить, что синтез-зависимый отжиг цепей чаще всего наблюдается во время митоза [69].

В 1991 году установлено, что восстановление структуры ДНК от радиационно-индуцированных ДР осуществляется в две фазы: быструю и медленную [70]. Двухфазные изменения количества фокусов γH2AX в течение 24 ч происходили независимо от стадии клеточного цикла как в G1, так и в G2 [71].

Двухфазная репарация радиационно-индуцированных повреждений ДНК была показана вначале для очень больших доз излучения - 100 Гр [72], 50 Гр [70], позднее для больши́х доз - 2 Гр [44], а в 2009 году и для малых доз - 5-100 мГр [43]. При снижении дозы воздействия наблюдали увеличение продолжительности быстрой фазы репарации. Так, например, для дозы 100 Гр 50% ДР восстанавливались за 14 мин, в то время как для 1 Гр - в течение 2-х ч.

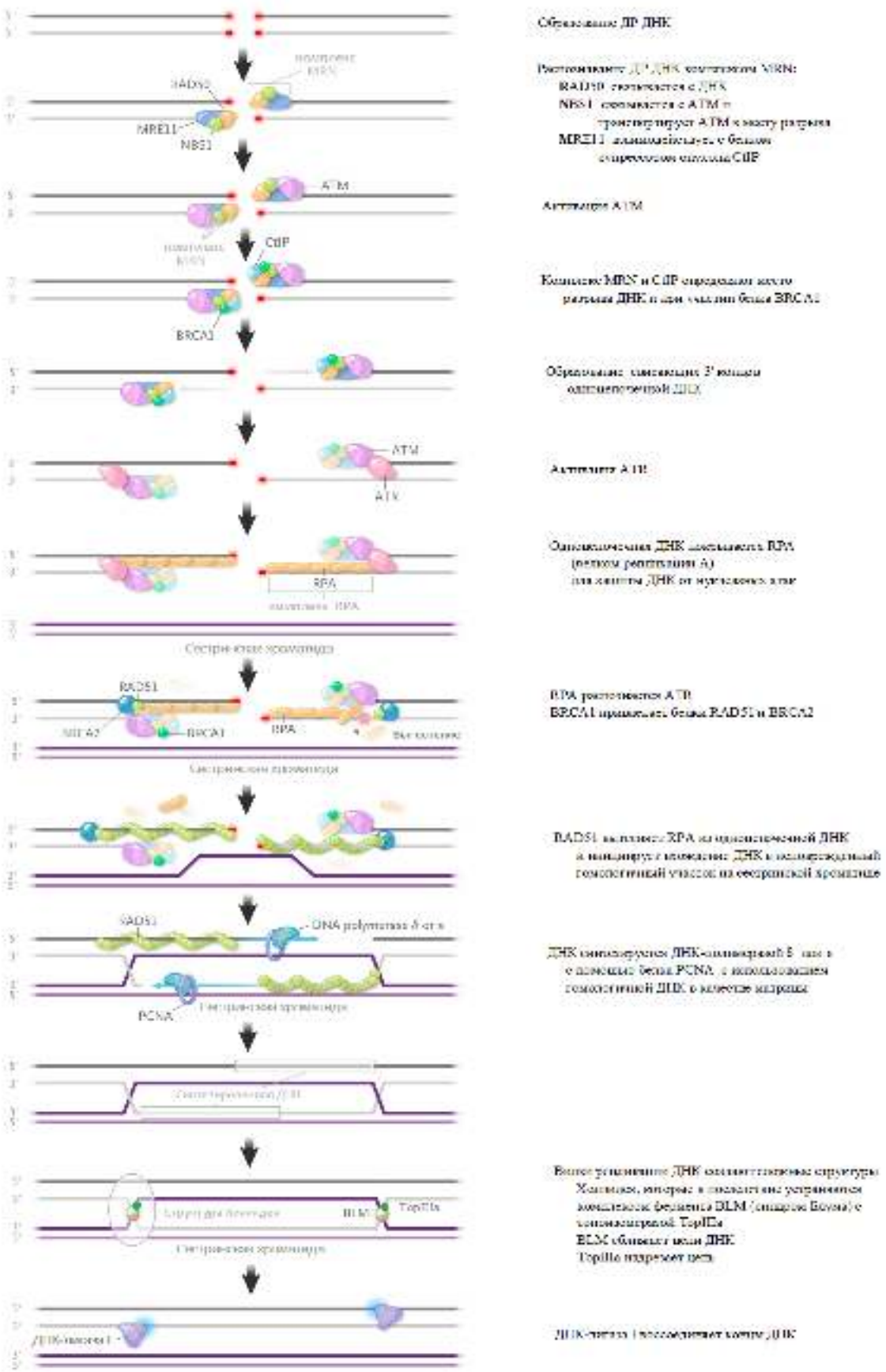


Рисунок 3. Репарация двунитевых разрывов ДНК по пути гомологичной рекомбинации.

Iliakis G. et al. (2004) показали, что основным механизмом, восстанавливающим ДР ДНК после радиационного воздействия, является ДНК-ПК зависимое НГСК [73]. Репарация ДР ДНК по пути НГСК восстанавливает около 80% ДР, вызванных рентгеновским излучением [74] и может происходить в любой фазе клеточного цикла, в то время как ГР осуществляется только в поздней S или G2-фазе при наличии сестринской хроматиды [75, 76].

Некоторые авторы считают, что ДНК-ПК является основной киназой, участвующей в репарации ДНК по пути негомологичного соединения концов (НГСК) [73, 77], а киназа ATM обеспечивает гомологичную рекомбинацию (ГР). Вместе с тем, в 2011 году Neal J.A. et al. установили, что фосфорилирование ДНК-ПК также стимулирует репарацию ДР ДНК по пути ГР [78].

1.3.3. Влияние структуры хроматина на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX

На выбор пути репарации ДР ДНК влияют как минимум три фактора: характер повреждений ДНК (простые или кластерные) [79]; структура хроматина [80] и стадия клеточного цикла [81].

С большой долей вероятности можно предполагать, что белки хроматина, изменяя способ укладки ДНК, способны регулировать процесс ее репарации. Так, было показано, что восстановление структуры ДНК от ДР происходит с более медленной кинетикой в гетерохроматине, чем в эухроматине [82]. Для эффективной репарации ДНК необходима релаксация структуры хроматина, поскольку конденсированный хроматин не дает возможности распространения фосфорилированного H2AX в ответ на повреждение ДНК [83]. Cowell I. G. et al. (2007) показали, что фосфорилирование H2AX по серину-139-му различается в зависимости от степени конденсации хроматина и происходит преимущественно в

эухроматине [84]. Kruhlak M. et al. (2006), применив электронную микроскопию, обнаружили уменьшение плотности хроматина на 30-40% в регионах, расположенных по обе стороны от ДР ДНК [85]. Плотность уменьшалась за счет АТФ-зависимого ремоделирования хроматина первичными сенсорами ДР ДНК (комплексом Rad17-RFC, состоящим из Rad17 и четырех небольших субъединиц репликативного комплекса RFC (RFC2, RFC3, RFC4, RFC5) и комплексом 9-1-1, включающим RAD9, HUS1 и RAD1) [86, 87]. Изменения структуры хроматина, как показали Bakkenist C. J. и Kastan M. B. (2003), активировали киназу ATM [59], которая, в свою очередь, взаимодействует с белком KAP-1, создающим существенный барьер для репарации ДР ДНК в гетерохроматине, и, тем самым, киназа ATM вызывает релаксацию хроматина для обеспечения доступа белков репарации к месту разрыва [88]. По данным Ziv Y. et al. (2006) ATM-зависимое фосфорилирование KAP-1 происходило в первые 30-60 мин после образования ДР ДНК [89]. Важно отметить, что ДР ДНК сохранялись в клетках, в которых фосфорилирование KAP-1 киназой ATM отсутствовало [90]. Аналогичные результаты были получены для маркера ДР - белка γH2AX. После облучения клеток в дозах 250-2000 мГр и ингибировании ATM доля γH2AX, связанная с гетерохроматином, составляла 60-70%, в то время как при активной киназе ATM была примерно 25% [88].

Итак, преимущественно киназа ATM участвует в репарации ДР ДНК в гетерохроматине и, соответсвенно, восстановление ДНК от повреждений в гетерохроматине идет по пути ГР. Это также подтверждается исследованием Schanz S. et al. (2012), в котором РИФ белка 53BP1, расположенные в гетерохроматине, не солокализуются с основными белками - участниками НГСК (Ku70 и ДНК-ПК) [91].

ИИ влияет на степень конденсации хроматина. В работе Belyaev I. и Harms-Ringdah M. (1996) на фибробластах человека линии VH-10, облученных в дозах 5-500 мГр установлено, что гетерохроматин в ядре

клеток релаксируется больше при действии ИИ в интервале доз от 20 до 40 мГр [92].

Таким образом, геометрия укладки ДНК в клетках и ее связь с белками хроматина влияют на скорость и эффективность репарации ДР ДНК.

1.3.4. Влияние фаз клеточного цикла на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX

Известно, что белок H2AX после образования ДР ДНК фосфорилируется во всех клетках, находящихся в разных фазах клеточного цикла, однако, число фокусов γH2AX в зависимости от фазы цикла заметно варьирует. К примеру, после облучения клеток γ-лучами в дозе 2 Гр РИФ γH2AX образуются в большем количестве в S- и G2- фазах по сравнению с G1 [93]. Аналогичная зависимость РИФ γH2AX от стадии, в которой находится клетка во время облучения, была продемонстрирована в работе Bee L. et al. (2013) при радиационном воздействии на клетки двух доз: 0,5 и 5 Гр [94]. Что касается клеток, находящихся в стадии митоза, то по данным Markova E. et al. (2007), в них количество фокусов было статистически значимо меньше, чем в клетках в интерфазе [36].

Большинство радиационно-индуцированных ДР ДНК репарируются во время остановки клеточного цикла, которая наступает, как правило, после образования в клетке более 10-20 ДР ДНК [95] и, по-видимому, зависит от дозы облучения. Так, Гильяно Н.Я. с соавт. показали, что к блокировке клеток в фазах G2/M клеточного цикла приводит воздействие γ-излучения иттербия-169 в дозах 330-1200 мГр [96]. Следует отметить, что в фибробластах, облученных в дозах до 100 мГр, остановка клеточного цикла не происходила [97], в них наблюдали стимуляцию клеточного деления. В опытах Liang X. et al. (2011) на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга крыс отмечено существенное увеличение доли клеток в S-фазе в ответ на рентгеновское облучение в дозе 75 мГр [98].

Репарация ДР ДНК в пролиферирующих клетках происходит по одному из двух основных путей: НГСК и ГР. НГСК преобладает в фазах G1 и ранней S, в то время как в поздней S- и G2-фазах возможны оба механизма репарации [76]. На стадии G1 репарация ДР ДНК происходит по пути НГСК как в быстрой, так и в медленной фазе восстановления. В клетках, находившихся на стадии G2, репарация по механизму НГСК наблюдалась в процессе быстрой фазы, а во время медленной фазы преобладала ГР, с участием которой восстанавливалось примерно 15% радиационно-индуцированных ДР ДНК [93]. Ранее было показано, что экспрессия уровня ключевого белка ГР - Rad51 коррелирует с фракцией пролиферирующих клеток [99], а максимальный уровень Rad51 в клетках регистрируется через 3 ч после радиационного воздействия и сохраняется до 6 ч [100].

При анализе эффективности ГР определенное внимание уделяется роли ATM, поскольку эта протеинкиназа участвует на заключительных стадиях при образовании одноцепочечной ДНК и последующего связывания ДНК с белками фактора репликации A (ФРА) и ключевого белка гомологичной рекомбинации - Rad51 [93]. Ингибирование ATM приводило к недостаточной гомологичной рекомбинации и увеличению «остаточных» фокусов Rad51/γH2AX через 24 ч после облучения клеток в дозе 2 Гр [101].

Таким образом, эффективная репарация ДР ДНК после радиационного воздействия зависит от работы белков репарации; степени компактизации хроматина, обуславливающей доступ компонентов систем репарации к повреждениям ДНК и прогрессии клеток по клеточному циклу.

1.4. Возможные причины длительного поддержания «остаточных» радиационно-индуцированных фокусов γH2AX

Эффективная репарация радиационно-индуцированных ДР ДНК завершается, оставляя в клетке, как правило, на длительный период некоторое количество, так называемых «остаточных» фокусов, число

которых частично зависит от дозы облучения. Так, по данным Vaurijoux A. (2017) в зависимости от дозы ИИ от 10% до 70% клеток содержат «остаточные» фокусы γH2AX через 24 ч после облучения. К этому времени их количество составляет 5-10 % от максимального значения, наблюдавшегося через 0,5 часа после радиационного воздействия [102]. Например, после облучения покоящихся лимфоцитов в дозах более 1000 мГр доля «остаточных» фокусов γH2AX через 24 часа составляла 13%, а через 48 часов – 6,6% от наблюдавшихся через 30 мин после воздействия. Количество «остаточных» фокусов после облучения клеток в дозе 200 мГр достигло через 48 ч контрольных значений [103]. При понижении дозы до 2,5 мГр ДР ДНК, определяемые иммуноцитохимическим анализом фокусов γH2AX, сохранялись нерепарированными в течение 72 ч [104].

Аналогичные результаты после облучения нормальных фибробластов человека линии MRC-5 в дозе 1,2 мГр были получены для «остаточных» фокусов киназы ATM. Так, через 24 ч после облучения в дозах 1,2 мГр; 20 мГр; 200 мГр и 1000 мГр было обнаружено, соответственно, 100%, 58%, 12% и 8,5% «остаточных» фокусов от исходного количества фосфорилированной киназы ATM [105].

Наряду с дозой радиационного воздействия на длительное пребывание в клетках РИФ влияет структура хроматина. Так, ДР ДНК, локализованные в гетерохроматине, могут привести к длительному сохранению РИФ [88].

Существенный вклад в количество «остаточных» фокусов оказывает фаза клеточного цикла, во время которой происходило радиационное воздействие. К примеру, γ-облученные покоящиеся клетки, восстановившие структуру ДНК от ДР, во время последующей репликации ДНК сохраняли вторично образованные ДР в течение более длительного периода по сравнению с ДР, индуцированными первично [95]. Об этом же свидетельствуют исследования Alessio N. et al. (2014), установивших наибольшее количество «остаточных» фокусов γH2AX в покоящихся

мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека через 48 ч после облучения в дозах 40-2000 мГр [106]. Увеличение доли пролиферирующих клеток, а именно, клеток находящихся в S-фазе, тоже влияет на количество «остаточных» фокусов γH2AX, возможно за счет образования ДР ДНК *de novo* за счет коллапса репликативной вилки [55].

Важным фактором, влияющим на уровень «остаточных» фокусов, является эффективность работы белков репарации и белковых фосфатаз 2A (PP2A) и PP4, которые ответственны за дефосфорилирование γH2AX [107, 108]. В работе Löbrich M. et al. (2010) было показано, что клеточные линии, имеющие дефекты в белках репарации, сохраняют больше ДР ДНК в течение 7 дней после облучения в дозах 3 и 80 Гр [42].

Существующая оценка прогностической значимости «остаточных» фокусов противоречива. По мнению Banath J.P. et al. (2010), присутствие в клетках «остаточных» фокусов γH2AX или Rad51 через 24 ч после облучения свидетельствует об их нежизнеспособности [109]. Alessio N. et al. (2015) в исследованиях на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека наблюдали дозозависимое снижение жизнеспособности (по тесту клоногенной активности) у клеток, имеющих «остаточные» фокусы [106].

Оппонирующие результаты приведены Sak A. et al. (2005). На 4-х клеточных линиях ими не выявлено корреляции между клоногенной выживаемостью и долей клеток, которые сохраняли «остаточные» фокусы белков γH2AX и Rad51 после их облучения в дозе 2 Гр [110]. Mahrhofer H. et al. (2006) на 10 нормальных и опухолевых клеточных линиях также не обнаружили связи между долей клеток с долгоживущими фокусами γH2AX, индуцированными ИИ в дозах 1-4 Гр, и их клоногенной активностью [44].

Таким образом, сведения о значении «остаточных» фокусов в облученных клетках неоднозначны. Приводятся доказательства в пользу как снижения жизнеспособности клеток, в которых сохраняется большое и при

том дозозависимое количество «остаточных» фокусов, так и об отсутствии их заметного влияния на клоногенность клеток.

Прогностическая значимость «остаточных» фокусов несомненна. Они могут использоваться в определенные сроки для оценки радиочувствительности [111], а также свидетельствовать о скорости и полноте восстановления структуры ДНК.

Анализ приведенной выше литературы позволил убедиться в надежной информативности иммуноцитохимического метода. С его применением стало возможным исследование механизма возникновения и репарации ДР ДНК в диапазоне малых доз 10-100 мГр.

При изучении радиационно-индуцированных повреждений ДНК использовались различные виды клеток, включая клеточные линии фибробластов (HCA, VH-10, HSF1, MRC-5). Особенность некоторых устоявшихся клеточных линий в том, что они содержат большое количество фоновых фокусов. Использование клеточных культур с большим количеством фоновых фокусов может отразиться на анализе результатов действия ИИ в малых дозах. Важно также отметить, что фоновый уровень фокусов может быть ассоциирован с различными клеточными процессами, включая старение. Поэтому изучение эффектов в первичных культурах рекомендуют проводить на ранних пассажах [112]. *Кроме того, отдельные выше приведенные авторы исследовали особенности образования и репарации ДР ДНК на непролиферирующей популяции фибробластов, исключая влияние клеточного цикла. Поэтому выбор клеточной модели и ее пролиферативный статус важны для изучения механизма действия ИИ.*

Анализ литературных данных, посвященных кинетике образования и репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК показал неполноту сведений о восстановлении структуры ДНК после облучения фибробластов в малых и средних дозах. В большинстве работ было использовано либо минимальное количество доз облучения (не более 2-х для каждого

диапазона), либо сроков исследования (см. Приложение А). В этой связи в нашей работе запланировано детальное исследование механизмов возникновения и репарации двунитевых разрывов ДНК на несинхронизированной популяции фибробластов кожи человека в течение первых суток после рентгеновского облучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культура клеток

В качестве объекта исследования были выбраны фибробласты кожи человека, поскольку внешнее радиационное воздействие на организм непременно затрагивает клетки кожи.

Фибробласты кожи человека являются клетками соединительной ткани, которые способны продуцировать компоненты межклеточного матрикса (фибронектин, коллаген I и III типа) [113, 114]. *In vitro* они сохраняют фенотипические характеристики, характерные для фибробластов *in vivo*: высокий уровень экспрессии CD90, CD105, CD73, низкий уровень экспрессии молекулы адгезии (CD54) и антигена комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и не экспрессируют маркеры прогениторных, гемопоэтических (CD14, CD34, CD45, CD31) клеток. Фибробласты в монослойной культуре активно пролиферируют [115], причем время удвоения популяции зависит от условий культивирования. Наименьшее среднее время удвоения популяции дермальных фибробластов составляет 28 ч [116].

2.1.1. Выделение фибробластов из биоптата кожи в заушной области

Исследования выполнены на культурах фибробластов, выделенных из биоптатов кожи здоровых доноров (мужчины 35–50 лет). На проведение исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Донору под местной анестезией 2%-ным раствором лидокаина проводили надрез кожи в заушной области площадью 2 × 2 мм. Биоптат помещали в среду для транспортировки (DMEM, содержащая 1 г/л D-глюкозы, 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, антибиотики) и немедленно доставляли в лабораторию.

Ткани биоптатов подвергали ферментативной обработке коллагеназой II типа (“Sigma”, Австрия). Полученные суспензии одиночных фибробластов культивировали в течение 14 сут при 37°С, 5% CO_2 в стандартной культуральной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) (“StemCell Technology”, США) с добавлением 2 ммоль/л L-глутамина (“StemCell Technology”, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (“StemCell Technology”, США) и 20% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Biological Industries”, Израиль) по методике [116]. В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0.05%-ным раствором трипсина и пассировали с плотностью 104 клетки/см^2 в той же культуральной среде, но с уменьшенным до 10% содержанием фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки пассировали, осуществляя замену питательной среды каждые 3 сут, до достижения культурой фибробластов 80–90% монослоя, после чего для хранения их замораживали в криопробирках. В работе использовали культуральную посуду фирмы “Corning-Costar” (США), реактивы фирмы “Sigma” (США).

2.1.2. Подготовка культуры фибробластов к экспериментам

Ранее заготовленные криопробирки с культурами клеток фибробластов быстро размораживали при 37°С, затем, медленно перемешивая, добавляли по капле стандартную культуральную среду до объема 50 мл. Аликвоту клеточной суспензии отбирали для оценки жизнеспособности клеток на автоматическом счетчике клеток “Countess” (“Invitrogen”, США) согласно протоколу производителя. После разморозки жизнеспособность клеток во всех образцах составляла не менее 92%. Клетки культивировали в течение 3 суток в полной среде.

В дальнейшем экспериментальные и контрольные культуры снимали с пластика раствором трипсина с 0.25% ЭДТА (“StemCell Technology”, США), отмывку клеток проводили в полной среде. Клетки пассировали в 35 мм

чашки Петри на покровные стекла (“SPL Lifesciences”, Южная Корея). Для экспериментов использовали клетки на 3-м пассаже в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~ 60-70%).

На 3-м пассаже перед проведением исследований, при достижении культурой клеток 80% монослоя, на проточном цитометре BD FACS Canto II (США) была проведена иммунофенотипическая характеристика клеток с помощью антител к поверхностным маркерам CD14, CD31, CD34, CD44, CD45, CD54, CD73, CD90, CD105, HLA-DR. Установлено, что клетки имели высокий уровень экспрессии CD44, CD73, CD90, CD105, низкий уровень экспрессии молекулы адгезии (CD54) и антигена комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и не экспрессировали маркеры прогениторных, гемопоэтических (CD14, CD31, CD34, CD45) клеток. Полученный фенотип полностью соответствовал фенотипу дермальных фибробластов и не изменялся в процессе культивирования.

2.2. Облучение культуры фибробластов

Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 40 мГр/мин, напряжении 100 кВ, токе 0.8 мА, фильтре 1.5 мм Al, и температуре 4°С (для охлаждения использовались термогранулы “LAB ARMOR BEADS”). Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15%. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях CO_2 инкубатора (37°С, 5% CO_2) в течение 5-1440 мин.

2.3. Проведение иммуноцитохимического анализа

2.3.1. Фиксация препаратов

Клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (4% в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре, затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4)

и пермеабилизировали 0.3% Тритон-Х100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания, по методике, описанной в работе [117].

2.3.2. Окрашивание препаратов

При проведении иммуноцитохимического окрашивания слайды инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами к белкам γH2AX (разведение 1/200, клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США), pATM (разведение 1/200, Merck-Millipore, США), Rad51(разведение 1/200, ABE257, Merck-Millipore, США), Ki67 (разведение 1/200; клон Ki- S5, Merck-Millipore, США), CENPF (разведение 1/200, ab5, Abcam, США) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина). Затем промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами, IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина.

Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (“Life Technologies”, США).

Принцип метода отражен на рисунке 4.

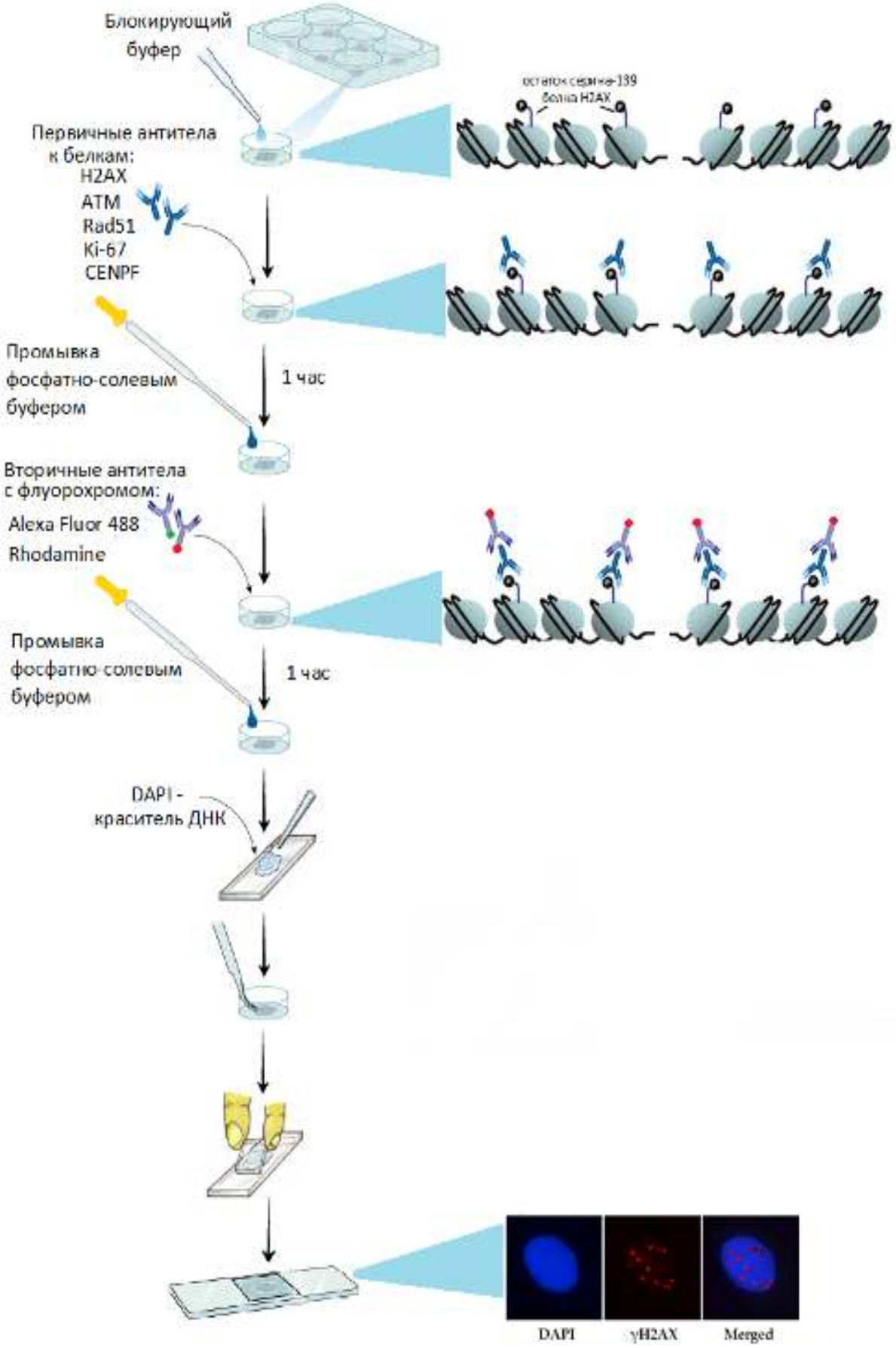


Рисунок 4. Принцип метода иммуноцитохимии.

2.3.3. Микроскопия

Визуализацию, документирование и обработку иммунноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (“Nikon”, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (“Jenoptik AG”, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340-380 нм возбуждение и 435-485 нм эмиссия) B-2E/C (465-495 нм возбуждение и 515-555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540-580 нм возбуждение и 600-660 нм эмиссия) и 60х объективом. Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γH2AX, Rad51 и фосфорилированного ATM (pATM) использовали программы Focicounter (http://focicounter.sourceforge.net/) и DARFI [118], а их солокализацию оценивали визуально.

Визуально также были определены клетки в различных фазах клеточного цикла (рисунок 5).

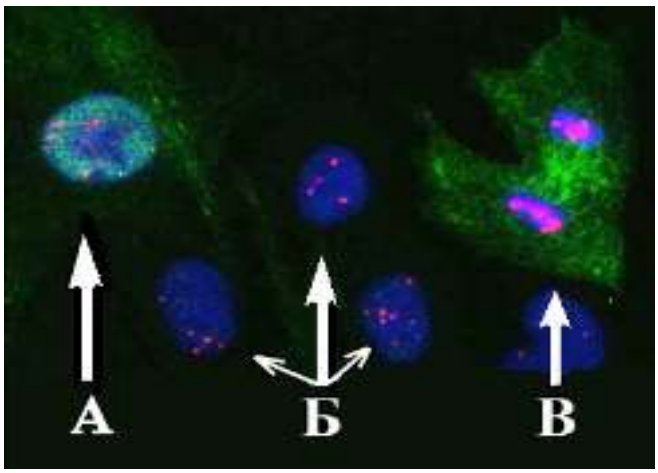


Рисунок 5. Микрофотография клеток, окрашенных антителами к белку CENPF для определения фаз клеточного цикла и антителами к белку H2AX для определения ДР ДНК через 30 мин после воздействия рентгеновского излучения в дозе 80 мГр.

А) клетка в S/G2 фазе (CENPF+ клетки)

Б) клетки в G0/G1 фазе (CENPF- клетки)

В) клетка в митозе

2.3.4. Математический анализ данных

Статистический и математический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов не менее трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка. Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Для оценки влияния дозы ИИ на «корректность» репарации ДР ДНК был проведен анализ вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДНК. Полученные экспериментальные данные единичных актов инициации фокусов Rad51 и их отношение к числу актов инициации фокусов H2AX можно математически интерпретировать, как вклад ГР в репарацию ДР ДНК.

Для анализа вклада ГР были построены кривые, аппроксимирующие экспериментальные значения количества фокусов γH2AX и Rad51. Для аппроксимации экспериментальных точек, на которых наблюдается уменьшение количества фокусов (для γH2AX - начиная с 1 ч, для Rad51 - начиная с 6 ч) была использована экспоненциальная функция вида:

$N = N_0 + A*exp^{-t/t_0}$, где

N – суммарное число фокусов,

N_0 - число фокусов в контроле,

A - амплитуда,

t - время,

t_0 - время, за которое число фокусов спадает в е раз или характерное время жизни фокусов

A и t_0 - свободные параметры. Параметры были подобраны методом наименьших квадратов, с использованием пакета scipy (https://www.scipy.org/).

Характерные времена (t_0) определялись по графику для дозы 1000мГр, где относительная ошибка была наименьшая. Значения этих времен составили для фокусов γH2AX – 3,18 ч, а для фокусов Rad51 – 7,49 ч и использовались в дальнейших расчетах вклада гомологичной рекомбинации для всех исследуемых доз.

Для расчета вклада гомологичной рекомбинации методом трапеций [119] рассчитывали площадь под кривой, описывающей изменение числа фокусов γH2AX, затем под кривой, описывающей изменение фокусов Rad51. На основании отношения площадей под кривыми Rad51 и γH2AX, деленного на отношение характерных времен жизни фокусов Rad51 и γH2AX был сделан вывод о вкладе ГР в репарацию ДНК в течение 24 ч с момента облучения.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изменения количества фокусов γH2AX в фибробластах человека после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр

Культуру клеток фибробластов человека подвергли воздействию рентгеновского излучения в дозах 20, 40, 80, 160, 250, 500 и 1000 мГр. После облучения клетки держали в инкубаторе в течение суток, забирая чашки по срокам для фиксации. Облученные клетки фиксировали через 15 и 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч, промывали, блокировали и добавляли к ним первичные антитела к белку H2AX. Для визуализации фокусов γH2AX применили вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом.

Выявленные в результате окрашивания фокусы фосфорилированного белка H2AX (γH2AX) являются общепринятым маркером двунитевых разрывов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДР ДНК).

Результаты оценки количественного выхода фокусов γH2AX в фибробластах кожи человека в зависимости от дозы облучения представлены на рисунке 6.

На рисунке 6 демонстрируется зависимость доза-эффект, которая в изученном временном диапазоне имеет линейный характер. Наклон кривой меняется с увеличением времени инкубации клеток после облучения.

Максимум фосфорилирования H2AX наступал через 0,25 – 1 ч после радиационного воздействия, что согласуется с данными, полученными методами проточной цитометрии [32, 120] и иммуноцитохимии [58, 121].

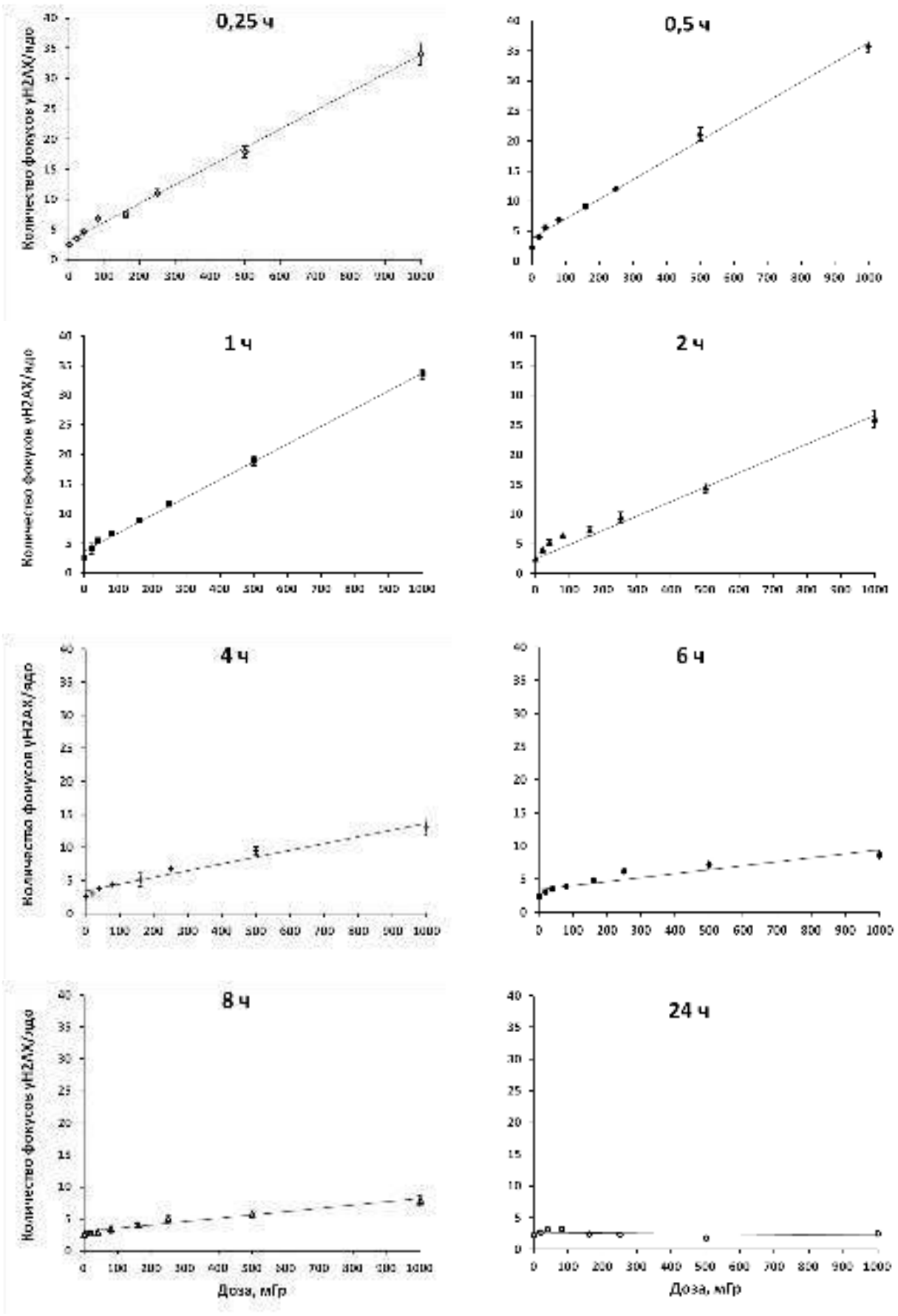


Рисунок 6. Зависимость количества фокусов γH2AX в фибробластах кожи человека от дозы облучения и времени после воздействия.

Зависимости доза-эффект в эти временные интервалы описываются уравнениями линейной регрессии:

$y = 3.1643 + 0.0307x$ ($r = 0.9982$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9941$) для 0,25 ч,

$y = 3.7721 + 0.0326x$ ($r = 0.9975$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9950$) для 0,5 ч и

$y = 3.7952 + 0.0300x$ ($r = 0.9983$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9965$) для 1 ч,

где y – среднее количество фокусов в клеточном ядре, x – доза облучения в мГр. Выход фокусов в среднем на единицу поглощенной дозы через 0,25 – 1 ч после облучения в дозах 20–1000 мГр равен 34,43 ± 0,67 фокусов на клетку/Гр, что практически совпадает с результатами Rothkamm K. и Lobrich M. (2003), составившими 36 фокус/клетка/Гр. Авторы применили облучение в дозах диапазона от 1 до 2000 мГр и иммуноцитохимический метод выявления ДР ДНК [29].

Продление времени инкубации клеток после облучения до 2 ч приводит к снижению количества фокусов γH2AX, индуцированных радиацией в дозах 160–1000 мГр. Среднее количество фокусов γH2AX в клетках, облученных в дозах 20–80 мГр, остается стабильным. При дальнейшем увеличении времени инкубации фибробластов после облучения наблюдается снижение количества фокусов γH2AX, что отражается графически уменьшением угла наклона прямой. Зависимость доза-эффект через 4, 6 и 8 ч описываются, соответственно, уравнениями линейной регрессии:

$y = 3.4077 + 0.0103x$ ($r = 0.9822$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9647$);

$y = 3.4168 + 0.0060x$ ($r = 0.9333$, $p = 0.0007$, $R^2 = 0.8711$);

$y = 3.0370 + 0.0052x$ ($r = 0.9762$, $p < 0.0001$, $R^2 = 0.9529$),

где y – среднее количество фокусов в клеточном ядре, x – доза облучения в мГр (рисунок 6).

Полученные результаты согласуются с данными Rothkamm K. и Lobrich M. (2003), установивших линейную зависимость количества фокусов γH2AX от доз 1-2000 мГр [29], а также с публикацией Asaithamby A. и Chen D. J. (2009) для доз диапазона 5-1000 мГр [43]. В нашем ранее

опубликованном исследовании также показана прямая зависимость количества фокусов γH2AX от дозы облучения (до 1500 мГр) [122].

Известно, что количество ДР в спирали ДНК зависит от нескольких факторов, в том числе от состояния клетки, и, в частности, фазы клеточного цикла, в которой она находится [95]. Для сравнения количества фокусов γH2AX в покоящихся и пролиферирующих фибробластах использовали в качестве маркера пролиферации белок Ki67 и белок CENPF, ассоциированный с центромерно-кинетохорным комплексом, который образуется во время фазы S/G2.

В работе Gerdes J. et al. (1984) было установлено, что белок Ki67 экспрессируется в клетках, находящихся на стадиях интерфазы (G1, S, G2) и митоза (M), так называемых Ki67 позитивных клетках (Ki67+), и отсутствует во время фазы G0 в Ki67 негативных клетках (Ki67-) [123].

На рисунке 7 представлены микрофотографии ядер фибробластов с фокусами γH2AX в Ki67+ и Ki67- клетках через 0,5 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозе 250 мГр.

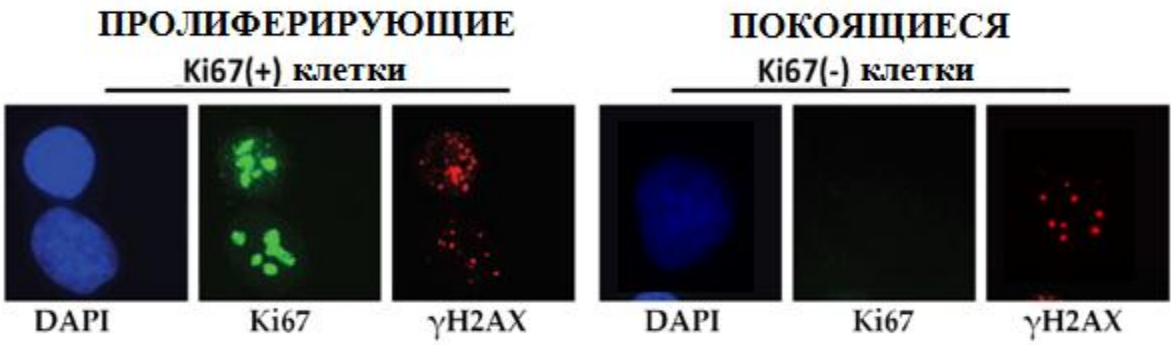


Рисунок 7. Микрофотография белка Ki67 и фокусов γH2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева на право: клеточное ядро, окрашенное DAPI; белок Ki67; фокусы γH2AX.

В качестве маркера клеток в S/G2 фазе использовали белок CENPF, ассоциированный с центромерно-кинетохорным комплексом, синтез которого начинается в S фазе и продолжает увеличиваться, достигая

максимального уровня в G2 фазе, так называемые CENPF позитивные клетки (CENPF+). На поздней G2 фазе CENPF связывается с кинетохором и остается с ним до ранней анафазы, после которой деградирует. Клетки, в которых отсутствует белок CENPF, считаются CENPF негативными клетками (CENPF-) и находятся в G0/G1 фазах [124]. На рисунке 8 показаны микрофотографии ядер фибробластов кожи человека с фокусами γH2AX в CENPF+ и CENPF- клетках через 0,5 ч после воздействия облучения в дозе 250 мГр.

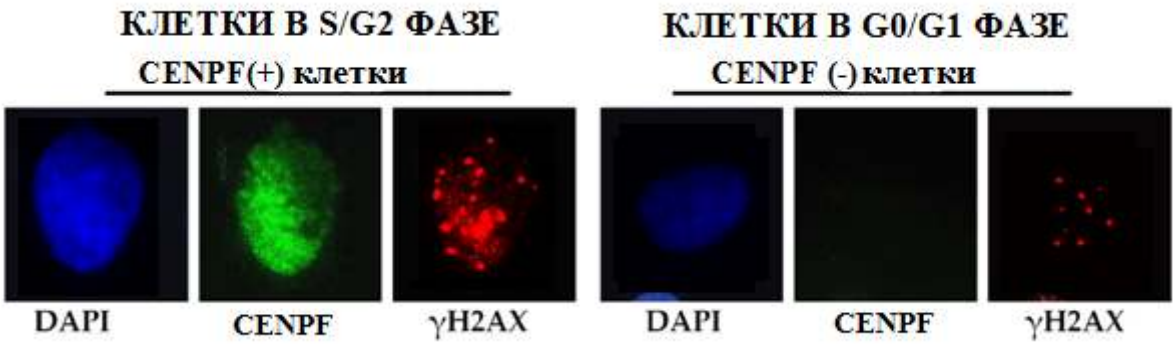


Рисунок 8. Микрофотография белка CENPF и фокусов γH2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева на право: клеточное ядро, окрашенное DAPI; белок CENPF; фокусы γH2AX.

Установлено, что в Ki67+ клетках фоновое количество фокусов γH2AX примерно в 3 раза ($p < 0.001$) выше, чем в Ki67- (5.07±0.51 и 1.77±0.27, соответственно) (рисунок 9А). Аналогично, в облученных фибробластах кожи человека в дозах всего используемого диапазона (80 – 1000 мГр) количество фокусов γH2AX было выше в субпопуляции Ki67+ клеток по сравнению с субпопуляцией Ki67- клеток. Эта закономерность выявляется в фибробластах при всех использованных дозах облучения.

Более значимые результаты по абсолютным значениям были получены при сравнительном анализе изменений фокусов γH2AX в CENPF+ и CENPF- клетках. Обнаружено, что даже в контрольных (необлученных)

CENPF+ клетках количество фокусов γH2AX примерно в 6 раз (p <0.001) выше, чем в CENPF- (11.39±0.58 и 1.80±0.18, соответственно) (рисунок 9Б). В облученных фибробластах кожи человека эта закономерность сохраняется при дозах 80, 250 и 1000 мГр. Количество фокусов γH2AX было выше в субпопуляции CENPF+ клеток по сравнению с субпопуляцией CENPF- клеток примерно в 1,5 – 3 раза. Это, по-видимому, обусловлено тем, что источником спонтанных ДР ДНК в пролиферирующих клетках является коллапс репликативных вилок в S- фазе клеточного цикла.

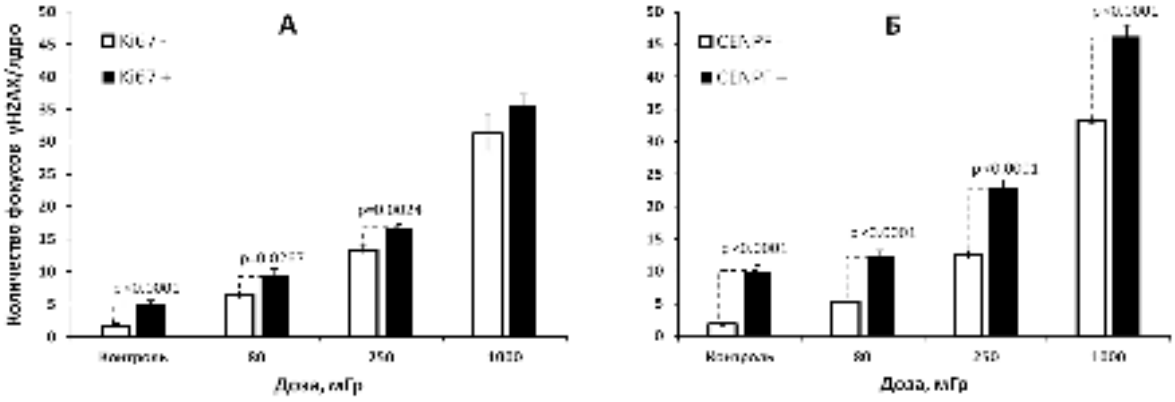


Рисунок 9. Количество фокусов γH2AX в покоящихся и пролиферирующих фибробластах через 0,5 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 80-1000 мГр.

А) Образование фокусов γH2AX в покоящихся (Ki67-) и пролиферирующих (Ki67+) клетках.

Б) Образование фокусов γH2AX в CENPF негативных и CENPF позитивных клетках.

Итак, в наших экспериментах подтверждена прямая зависимость между дозой облучения (20-1000 мГр) и количеством фокусов γH2AX через 0,25-8 ч после облучения. В опытах установлено также, что ответ клеток на радиационно-индуцированное повреждение ДНК зависит от стадии клеточного цикла, на которой произошло повреждение.

Результаты проведенных экспериментов дают основание заключить, что количество фокусов γH2AX имеют линейную дозовую зависимость до 8 ч после воздействия рентгеновского излучения в диапазоне доз 20-1000 мГр.

3.2. Пострадиационное восстановление структуры ДНК от двунитевых разрывов

Репарация повреждений ДНК представляет сложную скоординированную систему. От ее функционирования зависит судьба клетки. Экспрессия белков репарации изменяется в зависимости от многих факторов: дозы и вида ИИ, времени, прошедшего после облучения, фазы клеточного цикла, характера и сложности повреждения [40].

3.2.1. Оценка изменения количества фокусов γH2AX в фибробластах человека после облучения в дозах 20-1000 мГр

Результаты исследований кинетики пострадиационных изменений количества фокусов γH2AX в обученных фибробластах кожи человека представлены на рисунке 10.

Рисунок 10 демонстрирует, что наибольшее количество фокусов γH2AX после радиационного воздействия в дозах 160-1000 мГр образуется через 30 мин. На все последующие сроки исследования до 24 ч наблюдали снижение их количества по экспоненциальной зависимости до уровня контроля. При этом четко выделялась первая, быстрая фаза убыли фокусов γH2AX, которая заканчивалась через 4-6 ч. За это время происходило уменьшение количества фокусов на 50–70%. К концу второй, медленной фазы убыли фокусов γH2AX, то есть через 24 ч, в клетках регистрировали от 7 до 27% фокусов от наибольшего количества, установленного через 30 мин после воздействия ИИ.

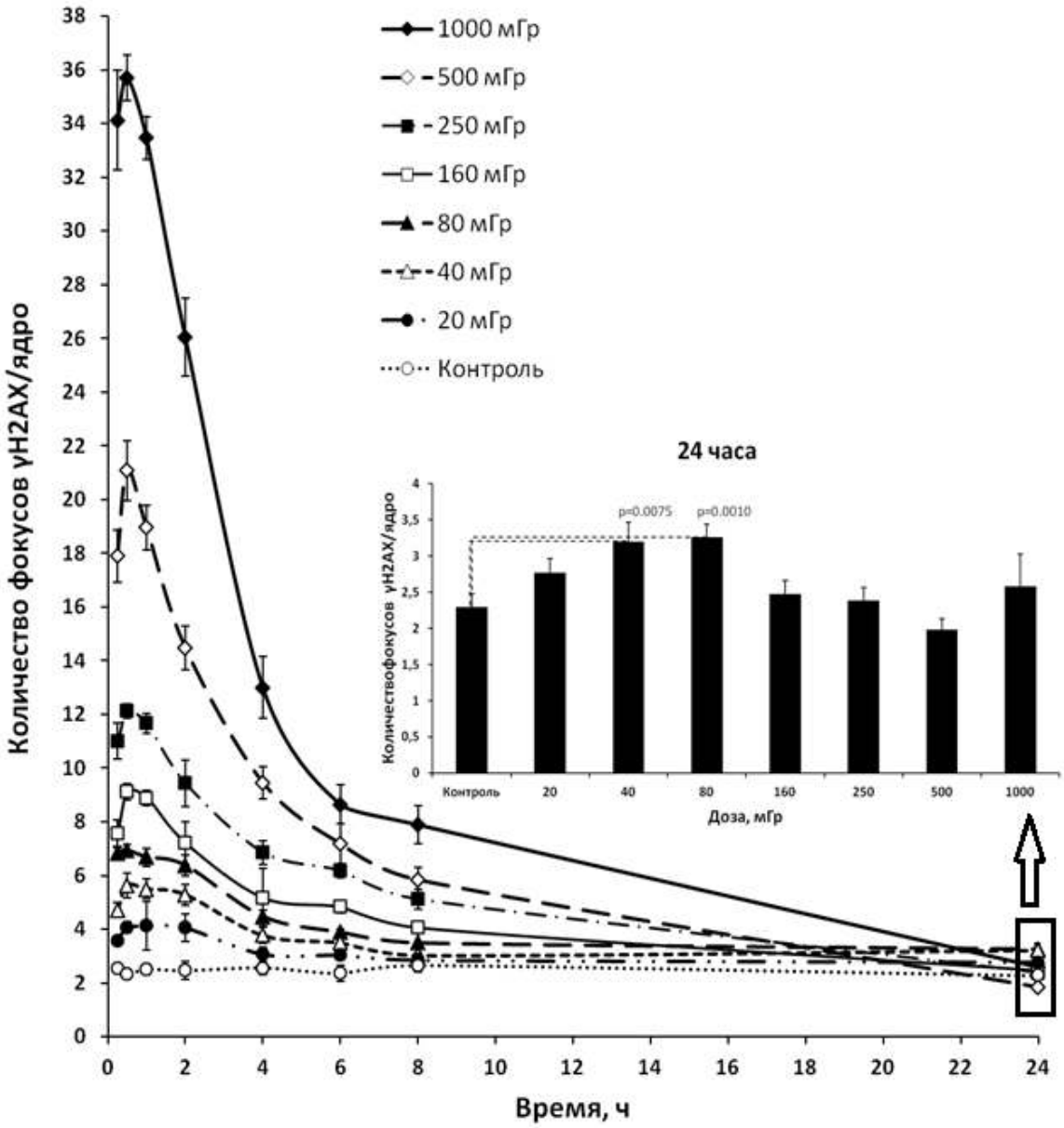


Рисунок 10. Изменения количества фокусов γH2AX в фибробластах кожи человека в первые 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр.

Аналогичное проявление быстрой и медленной фаз убыли радиационно-индуцированных повреждений ДНК было установлено ранее при воздействии на клетки очень больших доз (100 Гр) Kodym R. and Horth E. (1995) [72] и больших доз (2 Гр) Mahrhofer H. et.al. (2006) [44].

На рисунке 10 отражены также изменения количества фокусов γH2AX после воздействия ИИ в малых дозах (20 - 80 мГр). Как и при воздействии

средних доз, максимальное количество фокусов γH2AX определялось через 30 мин после облучения и существенно не изменялось в течение 2 ч. Фаза медленного снижения, начавшаяся через 4 ч после облучения, завершалась через 24 ч, когда остаток составлял 50 - 68% от максимального количества фокусов γH2AX.

«Остаточные» фокусы γH2AX представлены отдельно на гистограмме рисунка 10. Выявлено, что в клетках, облученных в малых дозах (40-80 мГр), количество «остаточных» фокусов γH2AX было выше, чем в контроле и в клетках, облученных в средних дозах. Следовательно, количество «остаточных» фокусов γH2AX находится в обратной зависимости от дозы облучения, что указывает на феномен длительного поддержания повышенного количества фокусов γH2AX после облучения в малых дозах.

Поскольку для редкоионизирующего излучения принято считать, что один фокус γH2AX равен одному ДР ДНК [29] была рассчитана, соответственно, доля элиминированных ДР ДНК от их максимального количества, определяемого через 30 мин после облучения (рисунок 11).

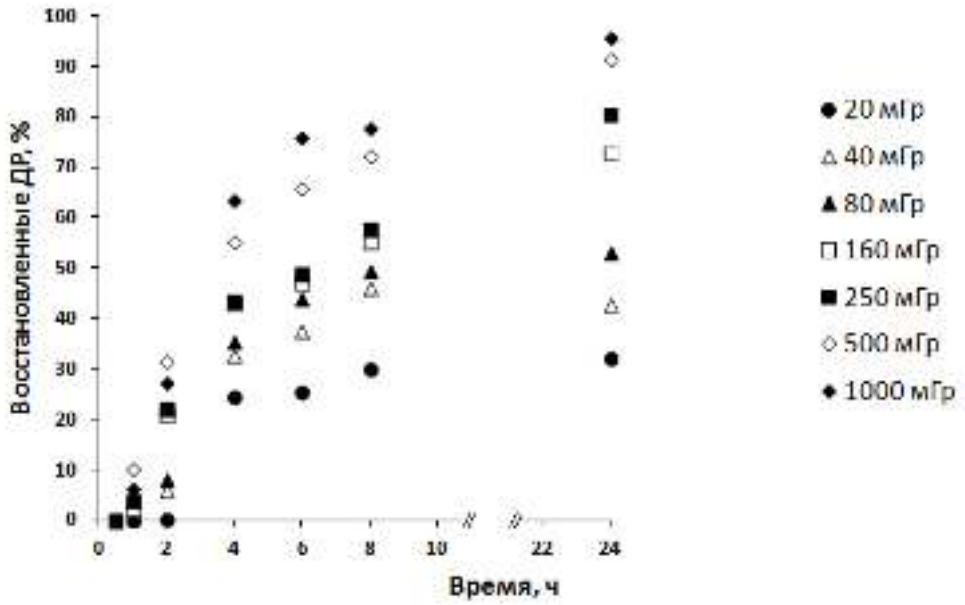


Рисунок 11. Доля элиминированных ДР ДНК в зависимости от времени после воздействия ИИ. Нормальные фибробласты кожи человека облучены в дозах 20-1000 мГр.

После воздействия рентгеновского излучения в малых дозах (20-80 мГр) наблюдали более медленное восстановление ДНК от ДР, по сравнению с временем восстановления структуры ДНК после облучения в дозах 160-1000 мГр. Доля элиминированных ДР ДНК через 2 ч после облучения в дозах малого диапазона не превышала 10%, в то время как для доз среднего диапазона (160-1000 мГр) составила 20-30%. Через 4 ч после облучения доля элиминированных ДР ДНК для доз малого и среднего диапазона составила, соответственно, 25-35% и 45-65%. Через 24 ч процент элиминированных ДР ДНК после облучения клеток в дозах 20-80 мГр достиг 50%, в то время как, ДР ДНК, вызванные ИИ в дозах 160-1000 мГр были элиминированы на 73-96%. Полученные нами результаты экспериментов, относящиеся к действию средних доз излучения, согласуются с результатами работ Wei K., Horth E. (1993) и Kodym R. et al. (1995) о прямой зависимости скорости репарации ДР ДНК от дозы облучения [72, 125].

Таким образом, процесс деградации фокусов γH2AX начинается через 30 мин после облучения фибробластов в средних дозах, проходя последовательно две фазы снижения: быструю и медленную. В клетках, облученных в малых дозах, деградация фокусов начинается позднее, через 2 ч, проходит также через две фазы: быструю и медленную, но не завершается через 24 ч. Что может объясняться либо задержкой восстановления структуры ДНК от ДР, либо появлением новых фокусов γH2AX.

3.2.2. Изменения количества и размера фокусов γH2AX и фокусов фосфорилированного белка ATM (pATM)

3.2.2.1. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на количество фокусов pATM и их солокализацию с фокусами γH2AX

На следующем этапе было проведено совместное исследование изменения количества фокусов γH2AX и киназы ATM. ATM является одной из основных киназ, принимающих участие в фосфорилировании гистона H2AX и репарации ДНК от радиационно-индуцированных ДР [59]. Для визуализации фокусов фосфорилированной (активной) киназы ATM (pATM) применили первичные антитела к белку ATM и вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом. Совместно с визуальным подсчетом количества фокусов pATM, учитывали фокусы γH2AX, а также их солокализацию в зависимости от дозы и времени после облучения.

На рисунке 12 представлены микрофотографии фокусов pATM, γH2AX и их солокализации в ядрах фибробластов через разные временные интервалы в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозе 1000 мГр.

Результаты и рассчитанные по ним зависимости количества фокусов в ядре клетки от дозы облучения и времени учета (5 мин; 30 мин; 4 ч; 8 ч) представлены на рисунке 13. Выбор первого срока исследования - 5 мин - обусловлен данными об активации ATM практически сразу после образования ДР ДНК [60]. Через 30 мин наблюдается максимум фосфорилирования корового белка H2AX [126]. Исследования через 4 и 8 ч обусловлены данными Riballo E. et al. (2004), установивших, что репарация радиационно-индуцированных ДР ДНК в медленной фазе является полностью ATM-зависимой [127].

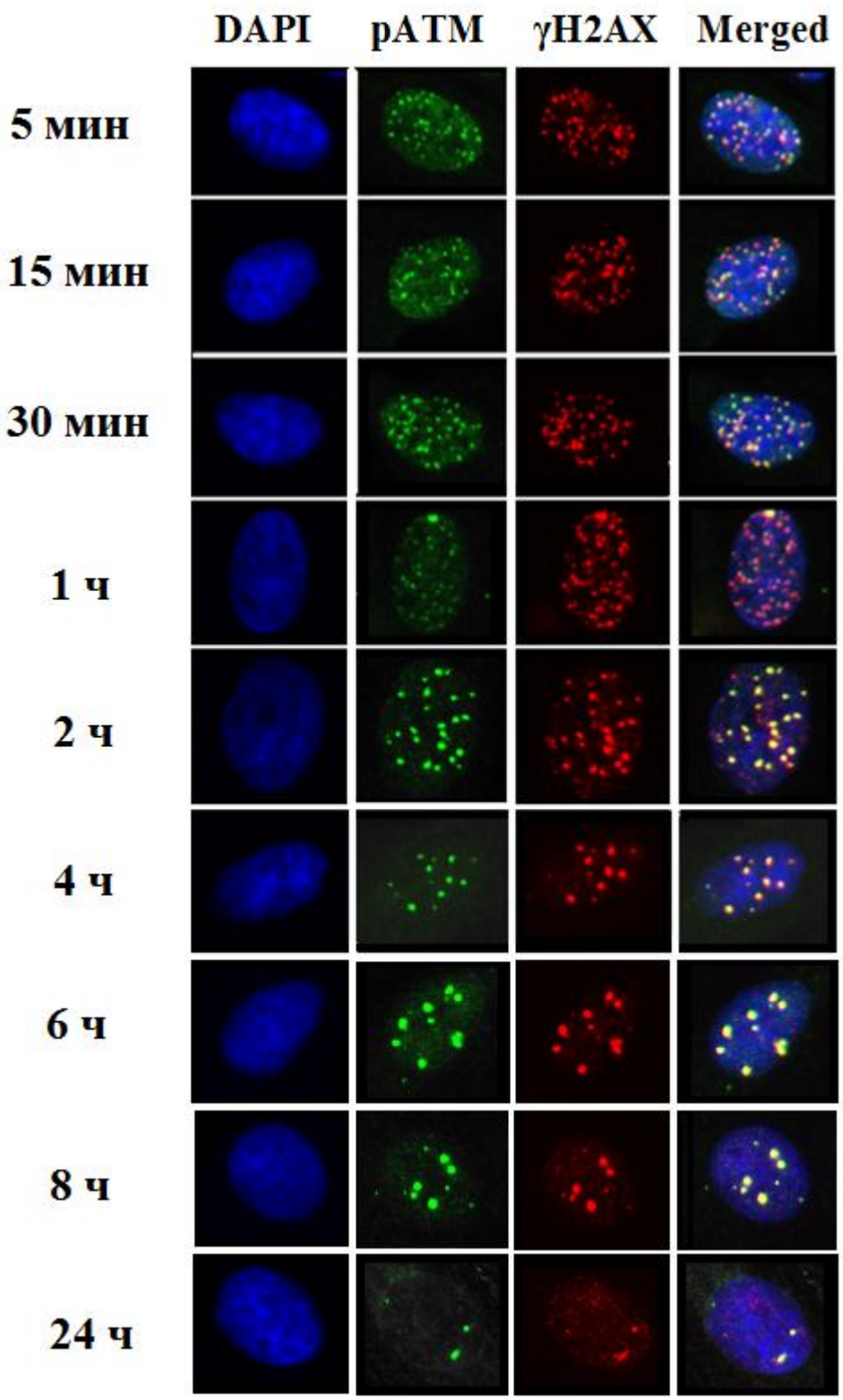


Рисунок 12. Микрофотографии фокусов pATM и γH2AX в ядрах фибробластов, облученных в дозе 1000 мГр. Слева направо: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы pATM; фокусы γH2AX; наложенные микроизображения (merged).

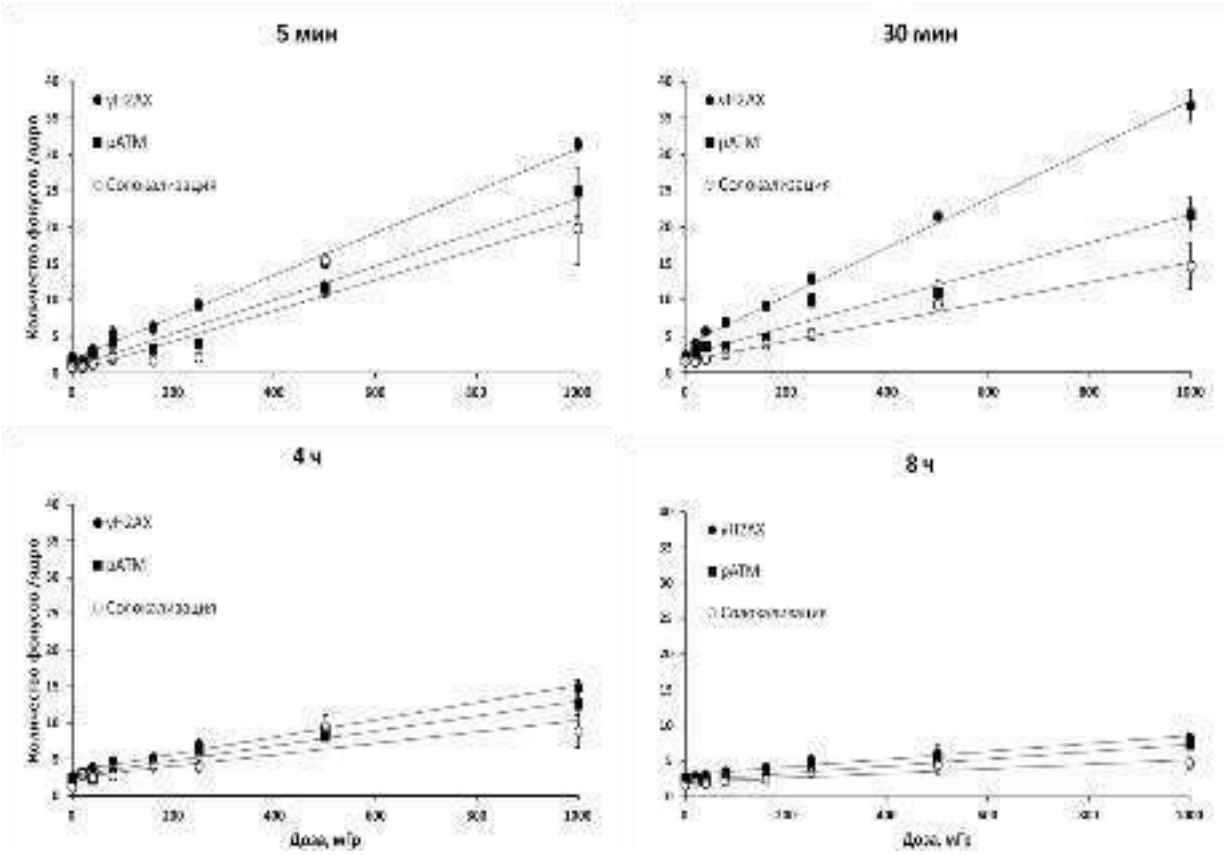


Рисунок 13. Зависимости количества фокусов γH2AX, pATM и их солокализация в ядрах фибробластов человека от дозы рентгеновского излучения и времени после воздействия.

Рисунок 13 демонстрирует, что во все сроки исследования наблюдается линейная зависимость количества фокусов γH2AX, pATM и их солокализация от дозы облучения. Через 5 мин после облучения зависимости количества фокусов γH2AX (1) и фокусов pATM (2) от доз ИИ описываются уравнениями линейной регрессии соответственно:

$$y_1 = 1.8673 + 0.0289x \ (r = 0.9969,\ p < 0.0001,\ R^2 = 0.9938),$$

$$y_2 = 0.7739 + 0.0231x \ (r = 0.9847,\ p < 0.0001,\ R^2 = 0.9696),$$

где y - среднее количество фокусов в клеточном ядре, x – доза облучения в мГр. Средние количества фокусов γH2AX и pATM на единицу поглощенной дозы через 5 мин после облучения составили соответственно 31,33±0,89 и 24,90±3,32 фокус/клетка/Гр.

При продлении времени инкубации клеток после облучения до 30 мин сохраняется линейный характер зависимости количества фокусов γH2AX и pATM от дозы облучения. Количество фокусов γH2AX определяется на уровне 36,68±2,22 фокус/клетка/Гр, а количество фокусов pATM составляет 21,77±2,29 фокус/клетка/Гр. Незначительное колебание количества фокусов pATM свидетельствует об ATM-независимом характере фосфорилирования H2AX в ранние сроки после облучения. После 4-х часовой инкубации клеток происходит уменьшение количества фокусов γH2AX и pATM. Наибольшая солокализация этих фокусов наблюдается через 8 ч после облучения. В это время зависимость фокусов γH2AX (1) и фокусов pATM (2) от дозы описываются уравнениями линейной регрессии, соответственно:

$$y_1 = 3.0217 + 0.0056x \ (r = 0.9813, p < 0.0001, R^2 = 0.9630),$$

$$y_2 = 2.2330 + 0.0051x \ (r = 0.9859, p < 0.0001, R^2 = 0.9720),$$

где y - среднее количество фокусов в клеточном ядре, x – доза облучения в мГр. Количественный выход фокусов γH2AX и pATM составил, соответственно, 8,26±0,19 и 7,26±0,51 фокус/клетка/Гр, что свидетельствует об ATM-зависимом характере фосфорилирования H2AX в поздние сроки после облучения (8 ч) для всех доз исследуемых диапазонов.

Установленная линейная зависимость количества фокусов pATM от дозы облучения в диапазоне 20-1000 мГр согласуется с результатами, опубликованными Suzuki K. et al. (2006), использовавших дозы от 100 до 1000 мГр [58]. В наших опытах впервые установлено независимое от ATM образование большого количества фокусов γH2AX в первые 5-10 мин и в течение последующих 2-х ч после облучения. Наши исследования, проведенные на фибробластах кожи человека, подтвердили, по-видимому, универсальный характер ATM-независимого фосфорилирования H2AX в ранние сроки для клеток из разных тканей. Они полностью согласуются с данными, установленными на мезенхимальных стволовых клетках десны [121] и с результатами исследований Riballo E. et al. (2004) об особой

значимости ATM киназы во время медленной фазы репарации ДР ДНК [127] для обеспечения более эффективной гомологичной рекомбинации [8, 101].

Количественные изменения фокусов γH2AX после воздействия малых и средних доз рентгеновского излучения различались. В связи с этим появилась необходимость определить, как отразились эти различия на количестве фокусов pATM и их солокализация с γH2AX.

Изменения количества фокусов γH2AX и pATM, а также их солокализизации в ядрах фибробластов после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр представлены на рисунке 14.

Подсчет фокусов pATM и их солокализации с фокусами γH2AX показал, что в случае облучения в дозах 160-1000 мГр максимум pATM (24,33±5,03 фокус/клетка/Гр) приходится на 5-15 мин после облучения с дальнейшим снижением их числа. Через 24 ч количество фокусов pATM, γH2AX и их солокализация уменьшается до уровня контроля (2,08±0,48 фокус/клетка). После облучения в дозах 20, 40 и 80 мГр максимальное количество фокусов pATM регистрировалось через 2 ч, с последующим уменьшением их количества до контрольных значений через 24 ч.

Полученные результаты согласуются с данными ряда авторов, обнаружившими максимальный уровень pATM через 5-30 мин после облучения клеток в диапазоне средних доз (для 300 мГр – 30 мин [40], для 500мГр – 5 мин [59], для 1000мГр – 15 [61] и 30 мин [58]).

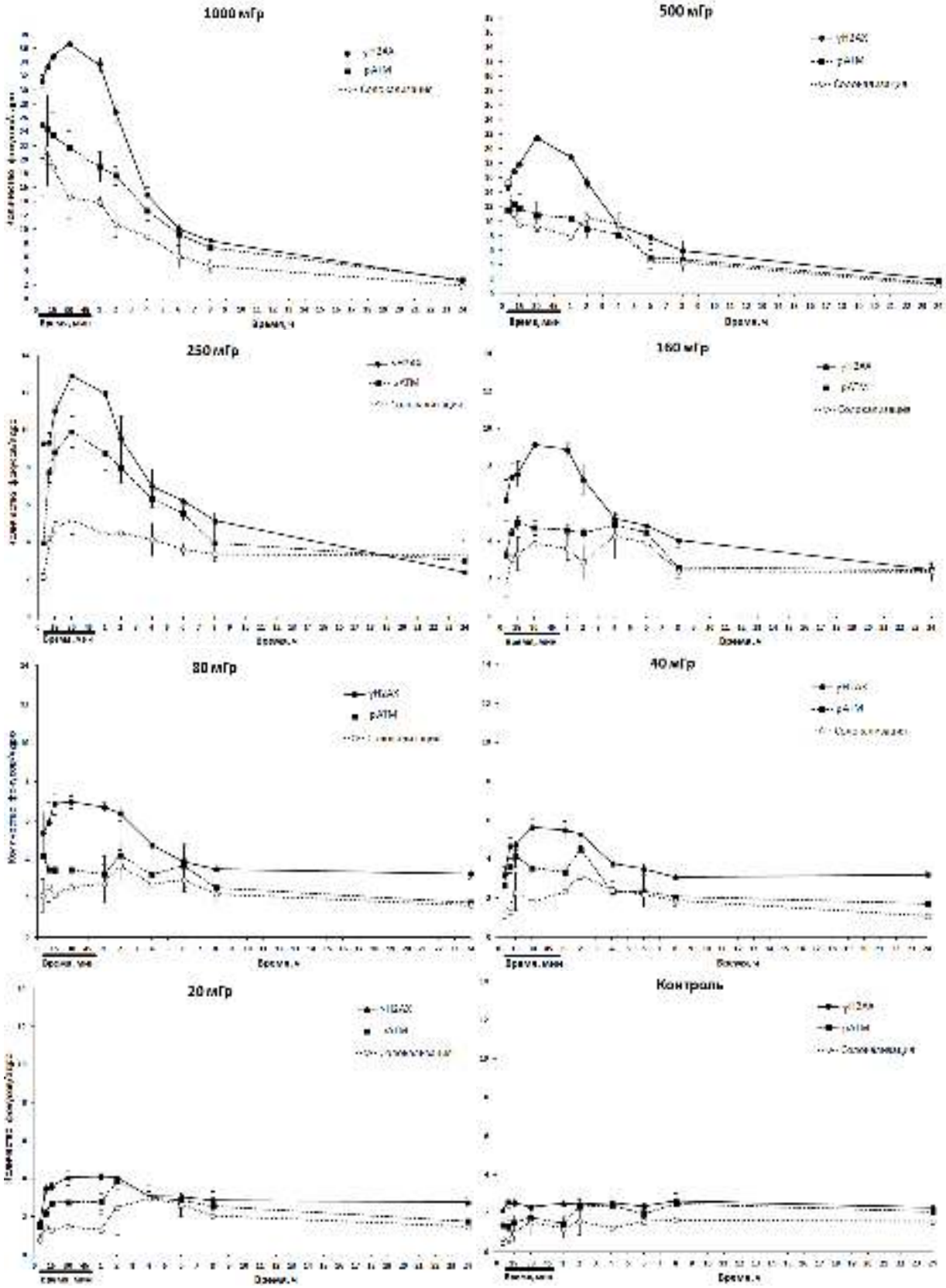


Рисунок 14. Изменения количества фокусов γH2AX, pATM и их солокализации в ядрах фибробластов в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в разных дозах.

Таким образом, проявились различия в количестве фокусов pATM после действия малых и средних доз. Максимальные количества фокусов pATM появляются в разное время: через 5-15 мин после воздействия средних доз и через 2 ч после облучения в малых дозах. Характер фосфорилирования гистона H2AX киназой ATM зависит от дозы облучения.

3.2.2.2. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на размер фокусов γH2AX и pATM

При исследовании фибробластов через 0,5 ч после облучения в дозах малого и среднего диапазонов в ядрах обнаружены мелкие фокусы γH2AX и pATM. Их средние размеры составляли соответственно 40,62±1,47 и 23,24±0,92 пикселей (рисунок 15).

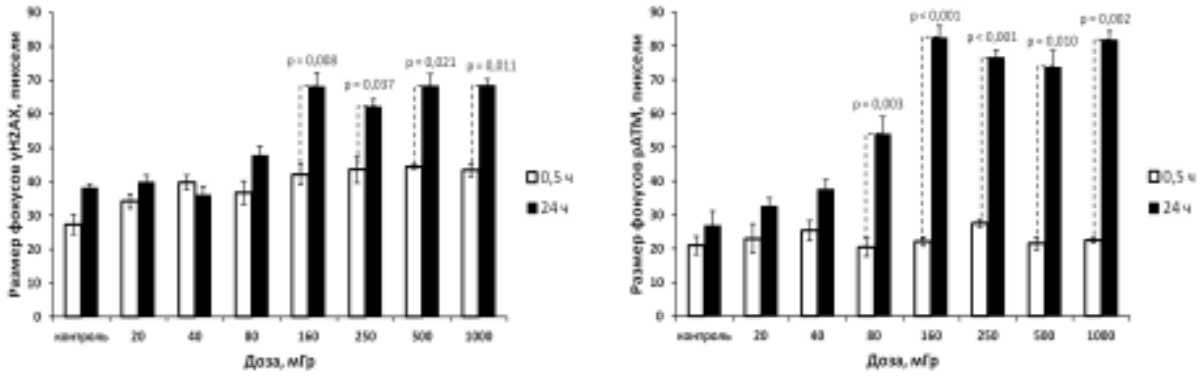


Рисунок 15. Размер фокусов γH2AX и pATM в ядрах фибробластов через 0,5 и 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр.

Через 24 ч в клетках, облученных в дозах 160-1000 мГр, средние размеры фокусов γH2AX и pATM увеличились соответственно в 1,5 и 3 раза. В то же время после облучения в дозах 20 и 40 мГр не было отмечено заметного увеличения размеров фокусов. Это различие может объясняться стимуляцией клеточной пролиферации, которая происходит после воздействия ИИ в малых дозах и была отмечена нами ранее [128].

Особого упоминания заслуживает доза 80 мГр, близкая к пограничной дозе 100 мГр между диапазонами малых и средних доз (по международной классификации НКДАР). При воздействии рентгеновского излучения в дозе 80 мГр через 24 ч происходило увеличение размеров фокусов pATM, но менее выраженное по сравнению с действием доз среднего диапазона. Можно предположить, что размер фокусов γH2AX и pATM через 24 ч после облучения ассоциирован со сложностью повреждений ДНК.

Результаты наших исследований согласуются с данными ранее опубликованных работ. Об образовании мелких фокусов белков репарации через 0,5 ч после облучения клеток сообщали Suzuki K. et al. (2006); Costes S.V. et al. (2006); Antonelli F. et al. (2015).

В исследованиях Suzuki K. et al. установлено, что средний размер фокусов pATM через 0,5 ч после воздействия был одинаковым в клетках, облученных в малой и средних дозах (20, 500 и 1000 мГр) [58]. В работе Antonelli F. et al. наблюдали изменения в первичных фибробластах линии AG01522, облученных в дозе 500 мГр, и установили через 0,5 ч появление небольших фокусов γH2AX размером менее 2 мкм^2 [129]. Costes S.V. et al. сообщили, что начальные размеры фокусов γH2AX и pATM в фибробластах человека линии HCA2 остаются неизменными в течение 2-х часов после рентгеновского воздействия в дозе 300 мГр [40].

Статистически значимое увеличение размеров фокусов pATM в 2,7 раза установлено в работе Yamauchi M. et al. (2008). Оно произошло через 24 ч после облучения клеток линии HE49 в дозе 1000 мГр [61]. Suzuki K. et al. (2012) отметили, что фокусы γH2AX укрупняются за счет солокализации с фокусами pATM, и высказали предположение, что совмещение фокусов способствует усилению сигнала о повреждении ДНК [130]. По данным Suzuki K. et al. (2006) размер фокусов белков репарации зависит не только от времени, прошедшего после облучения, но и от фазы цикла, в которой находится облучаемая клетка: в S-фазе формируются фокусы в 2 раза мельче (0,4 мкм), чем в фазах G1 и G2-фазе [58].

Поскольку доза 80 мГр близка к границе между диапазоном малых (10-100 мГр) и средних доз (100-1000 мГр), то среднее значение размера фокусов pATM после облучения фибробластов в дозе 80 мГр, вероятно, имеет «пороговые» эффекты при формировании размеров фокусов после облучения фибробластов в дозах 20,40 мГр и 160-1000 мГр.

Таким образом, проявились различия, как в количестве, так и в размере фокусов γH2AX и pATM после действия малых и средних доз. Размер фокусов белков репарации не изменялся через 24 ч после облучения фибробластов в дозах 20 и 40 мГр, в то время как регистрировалось статистически значимое увеличение размеров фокусов γH2AX и pATM после облучения клеток в дозах 160-1000 мГр.

3.2.3. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на количество фокусов Rad51

Для анализа «корректности» репарации ДР ДНК в фибробластах кожи человека после воздействия ИИ в дозах 20-1000 мГр исследовали изменения ключевого белка гомологичной рекомбинации - Rad51 [131].

Облученные клетки фиксировали в разные сроки после воздействия: через 15 и 30 мин, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч, промывали, блокировали и добавляли к ним первичные антитела к белку Rad51. Для визуализации образовавшегося комплекса антиген-антитело применяли вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом.

Достоверное увеличение количества фокусов Rad51 установлено через 2 ч после облучения (рисунок 16).

Максимальные количества фокусов Rad51 зарегистрированы через 6 ч после воздействия ИИ во всех дозах. Снижение количества фокусов Rad51 до контрольного уровня (1,32±0,12 фокус/клетка) происходило через 24 ч после облучения. Число возникших фокусов Rad51 было пропорционально дозе радиационного воздействия.

Установленное в этом эксперименте время регистрации максимального количества фокусов Rad51 совпало с опубликованным в работах Bishop D.K. et al. (1998), применивших для облучения клеток только одну дозу из диапазона «больших» - 9 Гр [100].

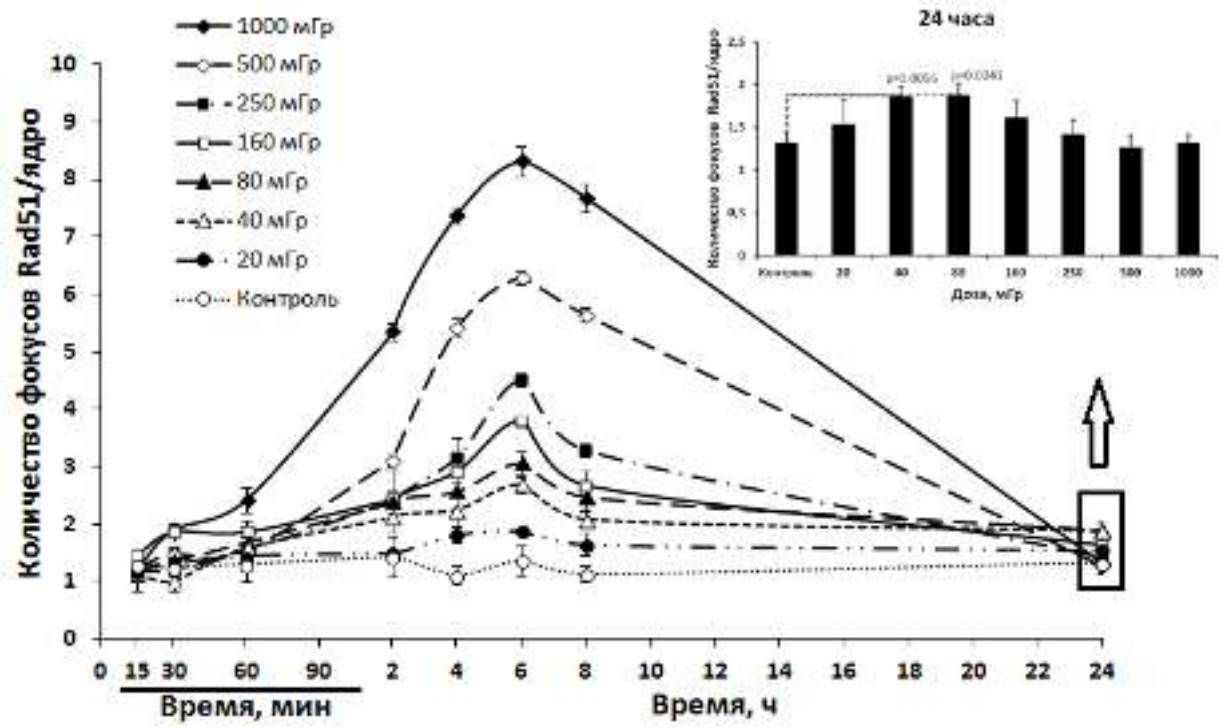


Рисунок 16. Изменения количества фокусов Rad51 в фибробластах человека в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20 - 1000 мГр.

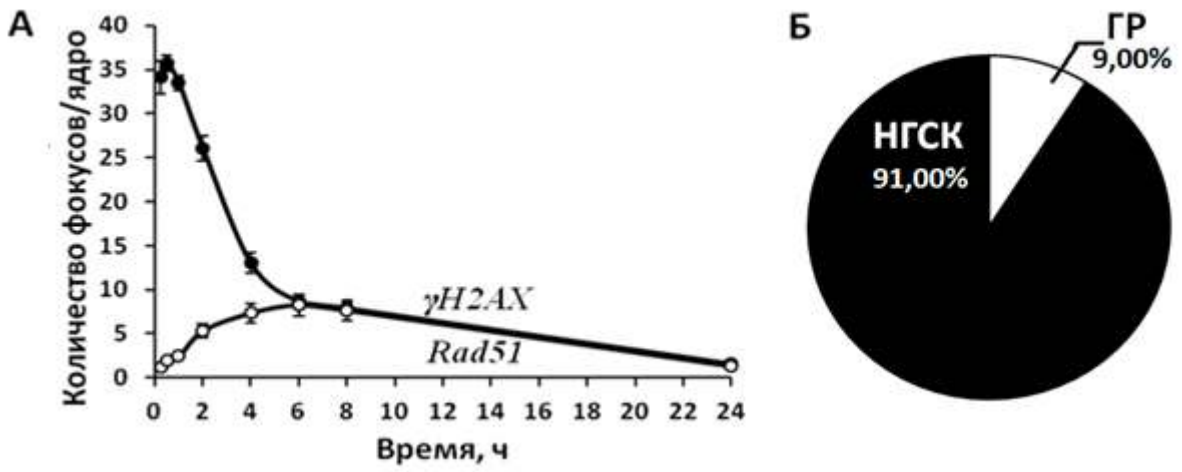
Среднее количество фокусов Rad51 через 24 ч после облучения в малых дозах составило 1,76±0,11 фокус/клетка и незначительно превысило показатель средних доз (1,40±0,08 фокус/клетка) и уровень контроля (1,32±0,12 фокус/клетка) (см. гистограмму рисунка 16). Подобные результаты: длительно-повышенного количества фокусов γH2AX были установлены после рентгеновского воздействия в дозах 20-80 мГр [126]. В связи с полученными результатами провели исследование количества фокусов γH2AX совместно с Rad51. При этом, рассчитав отношение числа единичных актов инициации фокусов Rad51 к числу таких актов для фокусов γH2AX, оценили вклад ГР в репарацию ДР ДНК.

На основании экспериментальных данных и построенных по ним графикам, методом трапеций была проведена оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК. Для этого рассчитывалась площадь под кривой, отражающей изменения фокусов γH2AX, затем под кривой, описывающей изменения фокусов Rad51. На основании результата отношения площадей под кривыми Rad51 и γH2AX, разделенного на отношение характерных времен жизни фокусов Rad51 и γH2AX был сделан вывод о проценте фокусов γH2AX, восстановленных по пути ГР в течение 24 ч с момента облучения. Процент фокусов γH2AX, восстановленных по пути ГР, можно интерпретировать как «корректно» репарированные ДР ДНК [132].

Оценка относительного вклада ГР в репарацию ДР ДНК проведена для всех исследуемых доз и детально представлена для 80, 250 и 1000 мГр.

В результате радиационного воздействия в дозе 1000 мГр на клетки вклад ГР в репарацию ДР ДНК в интервале 0,25-6 ч после облучения (быстрая фаза деградации фокусов γH2AX) был минимален (рисунок 17). Солокализация фокусов γH2AX с Rad51 после облучения 1000 мГр составила через 1ч и 24ч соответственно 7% и 51%. Основываясь на этих результатах можно сделать вывод, что для облученных в дозе 1000 мГр фибробластов основной вклад в репарацию ДР ДНК до 6 ч (время быстрой фазы репарации ДР ДНК) вносит НГСК. Через 6 ч после облучения практически все фокусы белка γH2AX солокализованы с фокусами белка Rad51 (рисунок 17А). Во время медленной фазы репарации ДР ДНК (от 6 до 24 ч) активизируется ГР. Согласно расчетам вклад ГР составлял 9% (рисунок 17Б).

Установленные результаты и наши выводы согласуются с данными Minakawa Y. et al. (2016), использовавших для облучения дозу 2 Гр. При этом солокализация фокусов γH2AX с Rad51 составила через 1 ч, 24 ч и 48 ч соответственно 4%, 88% и 85% [95].



В

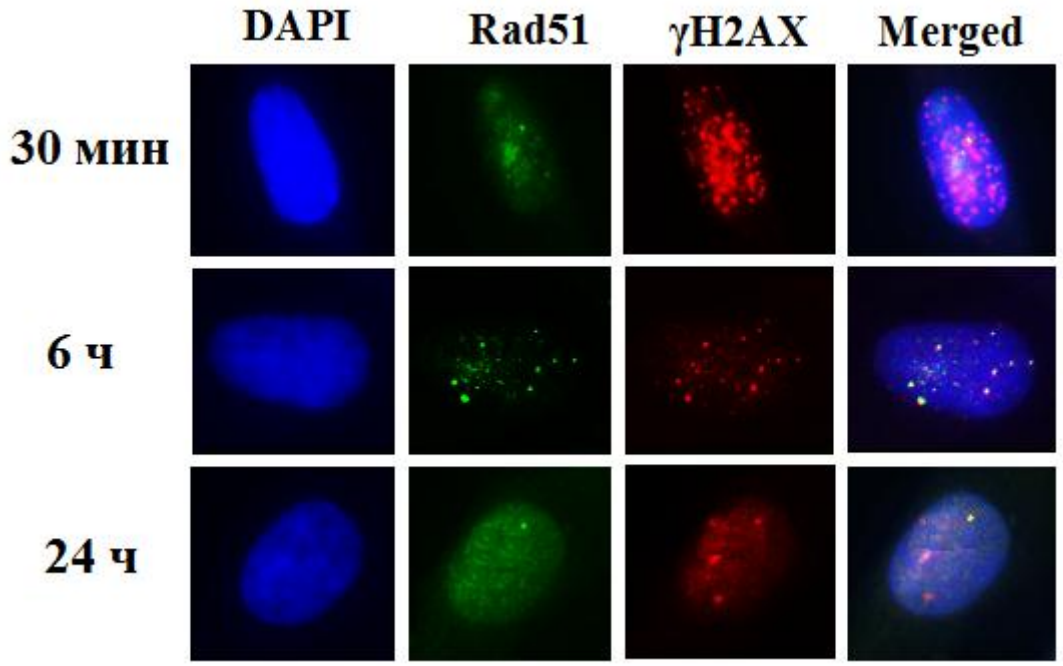


Рисунок 17. Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после воздействия рентгеновского излучения в дозе 1000 мГр.

А. Изменения количества фокусов γH2AX и Rad51.

Б. Относительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДНК, рассчитанный методом трапеций.

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γH2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева на право: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γH2AX; наложенные микроизображения (merged).

При снижении дозы облучения до 250 мГр солокализация фокусов γH2AX с Rad51 через 1 ч после воздействия была 13% и через 24 ч - 60% (рисунок 18А).

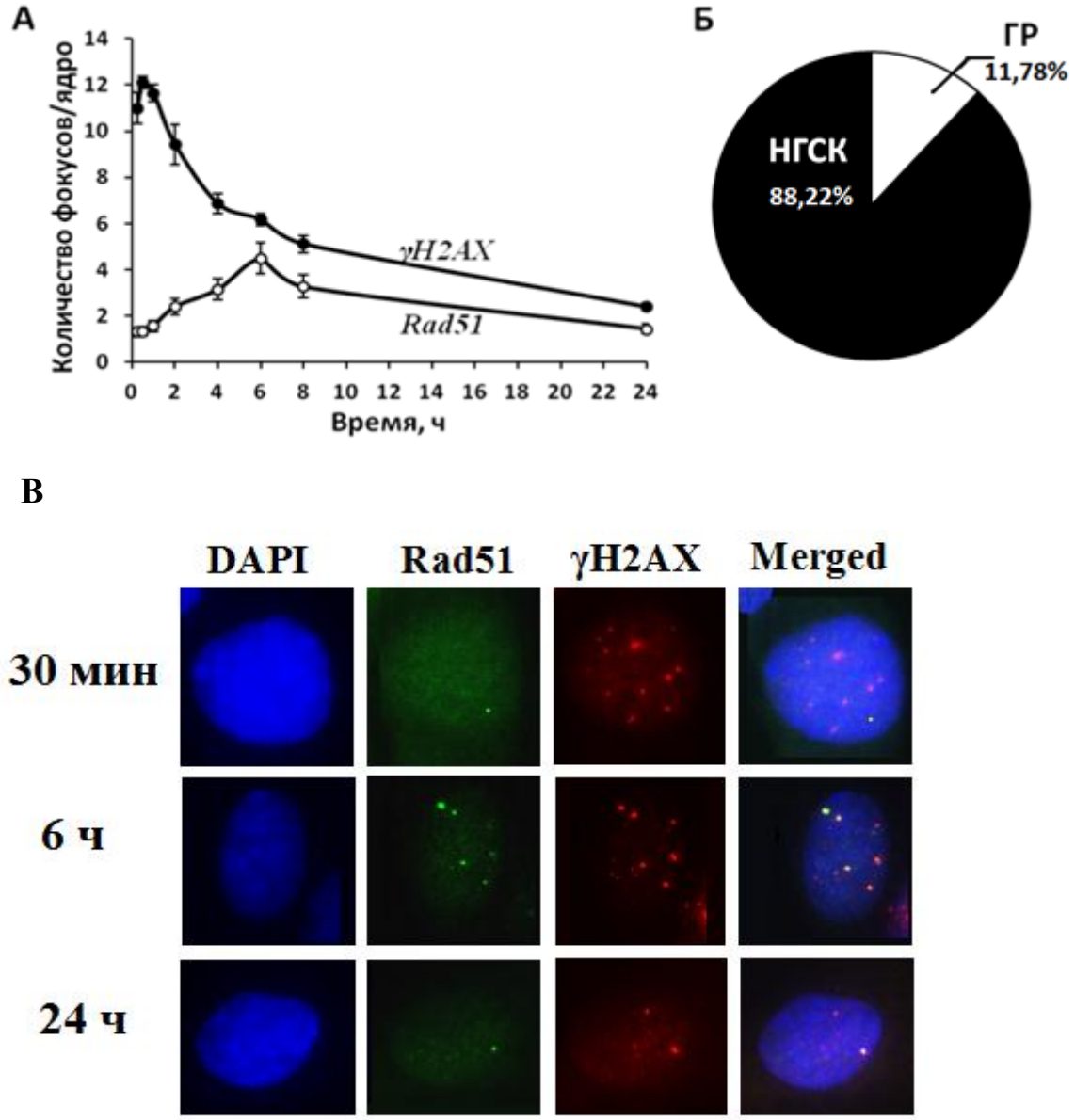


Рисунок 18. Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после воздействия рентгеновского излучения в дозе 250 мГр.

А. Изменения количества фокусов γH2AX и Rad51.

Б. Относительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДНК, рассчитанный методом трапеций.

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γH2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева на право: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γH2AX; наложенные микроизображения (merged).

Соответственно, снижение дозы облучения клеток приводит к увеличению вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК. Согласно расчетам, после облучения клеток в дозе 250 мГр вклад гомологичной рекомбинации составлял приблизительно 12% (рисунок 18Б).

Дальнейшее исследование вклада ГР в репарацию ДР ДНК провели с использованием малой дозы - 80 мГр. Солокализация фокусов γH2AX с Rad51 составила 25% через 1 ч после облучения и 58% через 24 ч (рисунок 19А). Доля ГР после облучения клеток в дозе 80 мГр, согласно расчетам, равнялась 16% (рисунок 19Б).

Итак, ДР ДНК репарировались в течение 24 ч после облучения в малой дозе (80 мГр) в большей пропорции по пути ГР, то есть «корректнее», чем после облучения в средних дозах (250 и 1000 мГр). Этот результат предположительно можно объяснить тем, что облучение в средних дозах запускает более быстрый механизм репарации – НГСК. В результате вклад ГР в репарацию ДР ДНК после облучения в средних дозах был в 1,5 раза меньше, чем после облучения в малой дозе.

Кроме того, в представленный расчет важно внести поправку на механизм репарации фоновых фокусов γH2AX. Основываясь на результатах эксперимента с необлученными фибробластами по показателям количества фокусов фосфорилированных белков H2AX и Rad51, используя метод трапеций и поправочный коэффициент на время жизни фокусов, рассчитали также относительный вклад ГР в репарацию ДНК. В контрольной популяции фибробластов 22% ДР ДНК репарировались посредством ГР, а вторая часть (78%) по пути НГСК (рисунок 20Б).

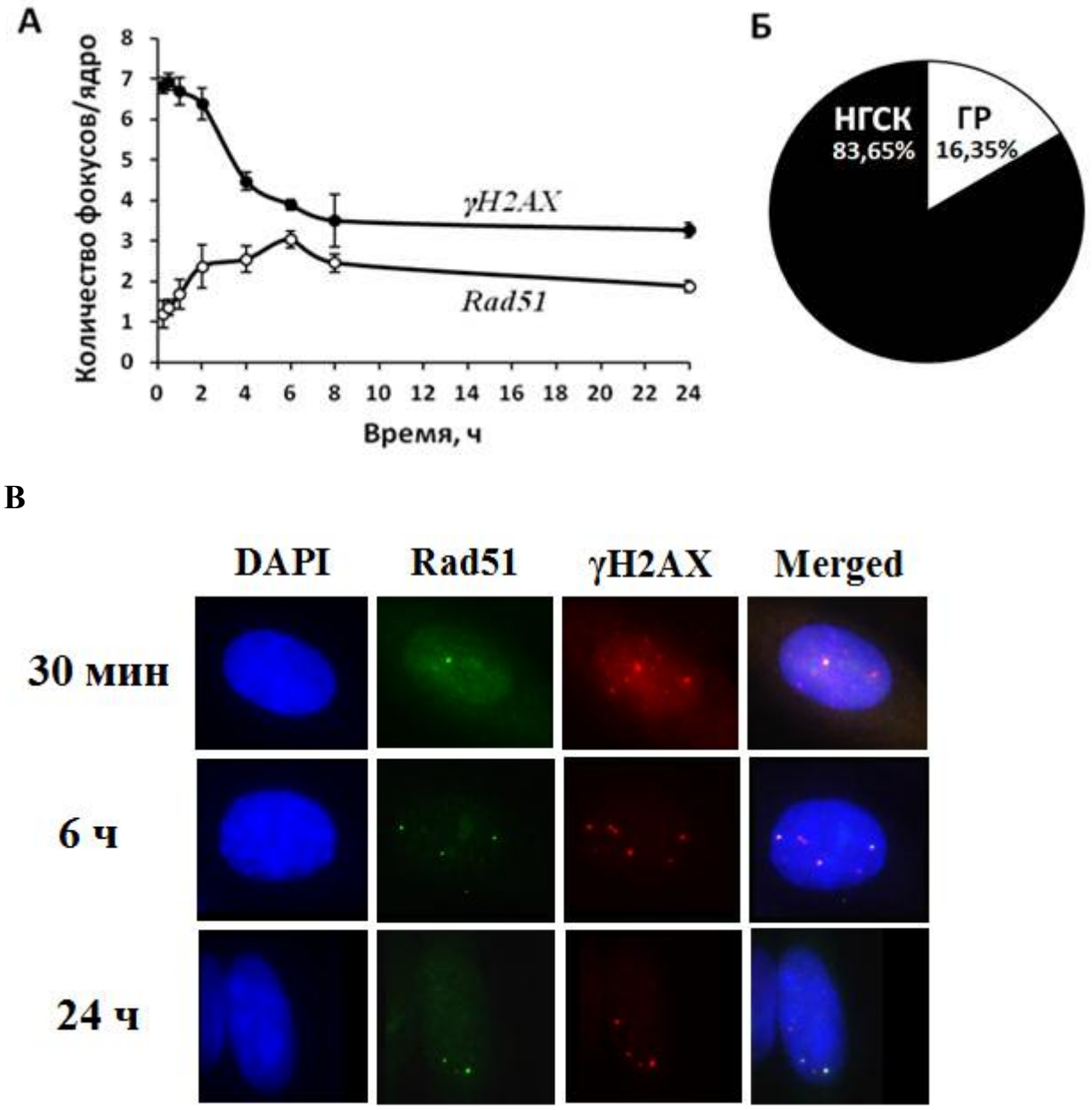


Рисунок 19. Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после воздействия рентгеновского излучения в дозе 80 мГр.

А. Изменения количества фокусов γH2AX и Rad51.

Б. Относительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДНК, рассчитанный методом трапеций.

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γH2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева на право: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γH2AX; наложенные микроизображения (merged).

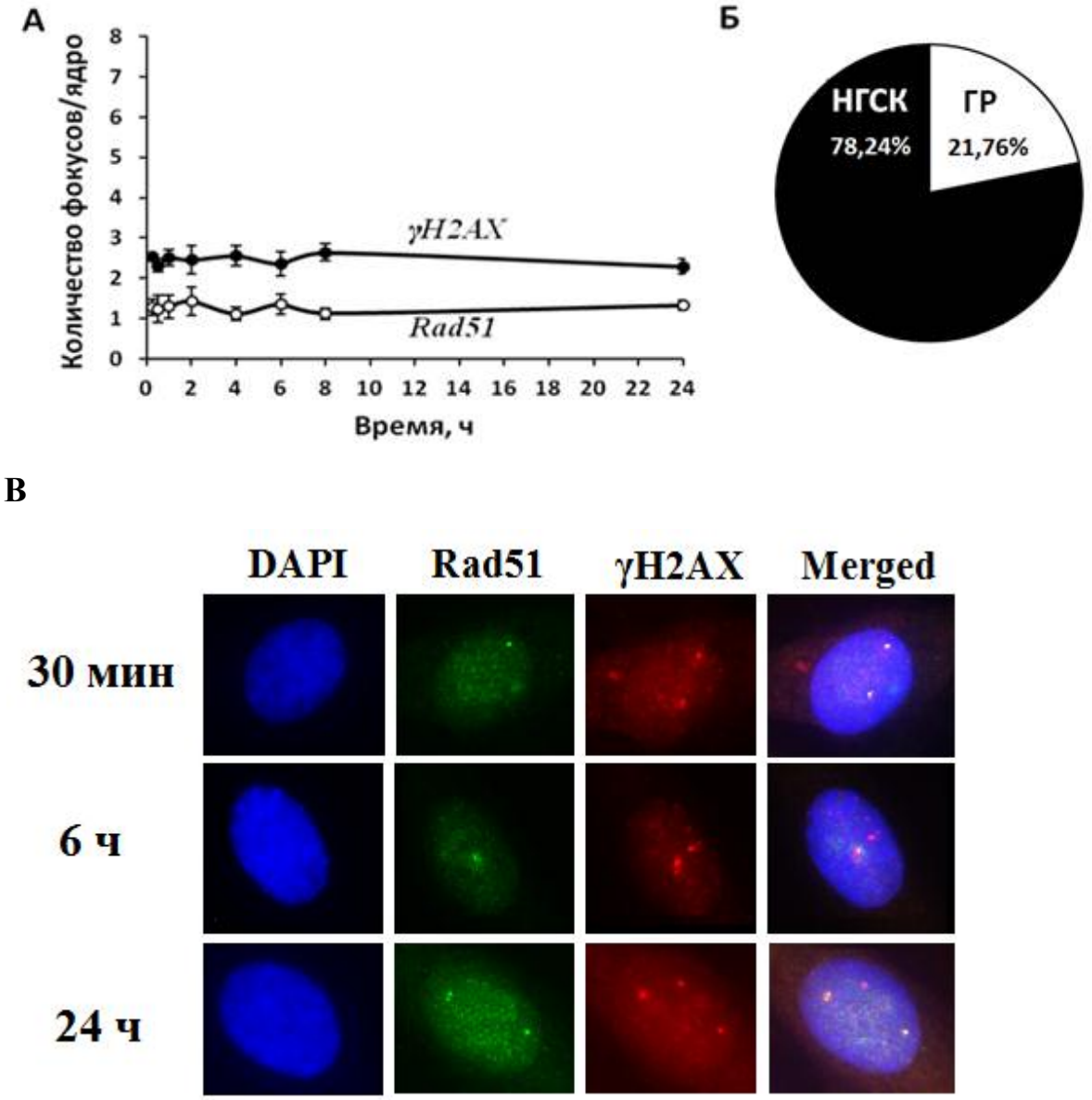


Рисунок 20. Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК в необлученных фибробластах кожи человека

А. Изменения количества фокусов γH2AX и Rad51 в контрольной (необлученной) популяции.

Б. Относительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДНК, рассчитанный методом трапеций.

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γH2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева на право: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γH2AX; наложенные микроизображения (merged).

Следовательно, наибольший вклад ГР вносит в репарацию ДНК в необлученной популяции фибробластов. При этом следует учитывать, что аккумулирование фоновых фокусов может иметь кинетику, отличную от радиационно-индуцированных фокусов [112]. После облучения клеток в дозах малого диапазона (20-80 мГр) относительный вклад ГР снижается с 22 до 16-18% (рисунок 21). Увеличение дозы облучения клеток до средних приводит к дальнейшему снижению вклада ГР в репарацию ДР ДНК. Так, после облучения фибробластов в дозе 1000 мГр вклад ГР составил 9%.

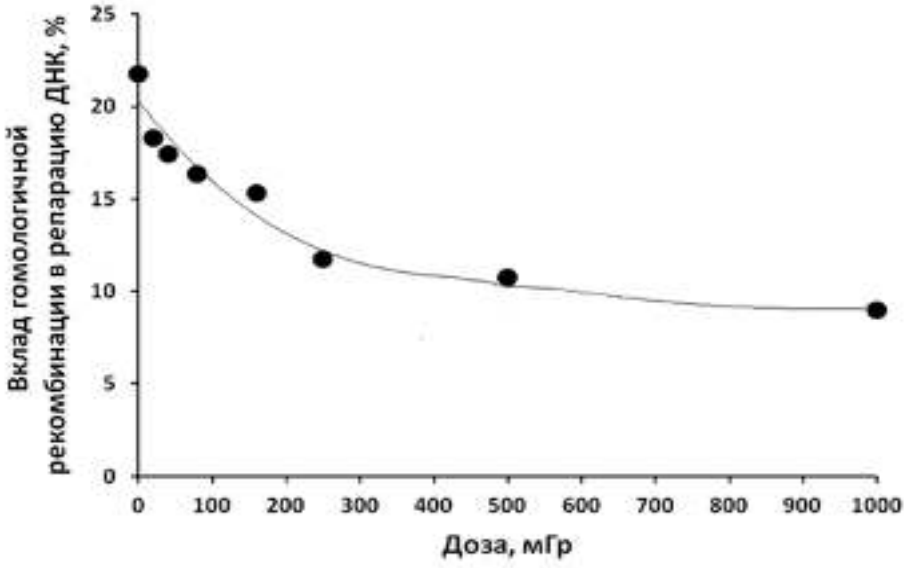


Рисунок 21. Зависимость вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК от дозы облучения, рассчитанная методом трапеций.

Таким образом, приведенные в диссертации и ранее опубликованные в работе [132] данные свидетельствуют о том, что относительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию двунитевых разрывов ДНК после облучения клеток в дозе 80 мГр был в 1,5 раза больше, чем после облучения в средних дозах. Соответственно, репарация ДР ДНК, индуцированных малыми дозами (20-80 мГр), происходила более «корректно», чем после воздействия ИИ в средних дозах (160-1000 мГр).

3.3. «Остаточные» фокусы γH2AX, pATM и Rad51 через 24 ч после облучения фибробластов.

Суточный ответ фибробластов на радиационно-индуцированные повреждения ДНК различался и зависел от уровня воздействующих доз: малых или средних. Для оценки состояния клеток через 24 ч после лучевого воздействия были использованы соответствующие малые (80 мГр) и средние (250 и 1000 мГр) дозы.

3.3.1. «Остаточные» фокусы γH2AX

Количество фокусов γH2AX существенно уменьшалось через 24 ч после лучевого воздействия и в зависимости от дозы облучения: 1000 мГр, 250 мГр и 80 мГр составило по отношению к максимальным значениям через 0,5 ч, соответственно, 7,22±1,08%; 19,67±2,95% и 47,04±7,06% (рисунок 22).

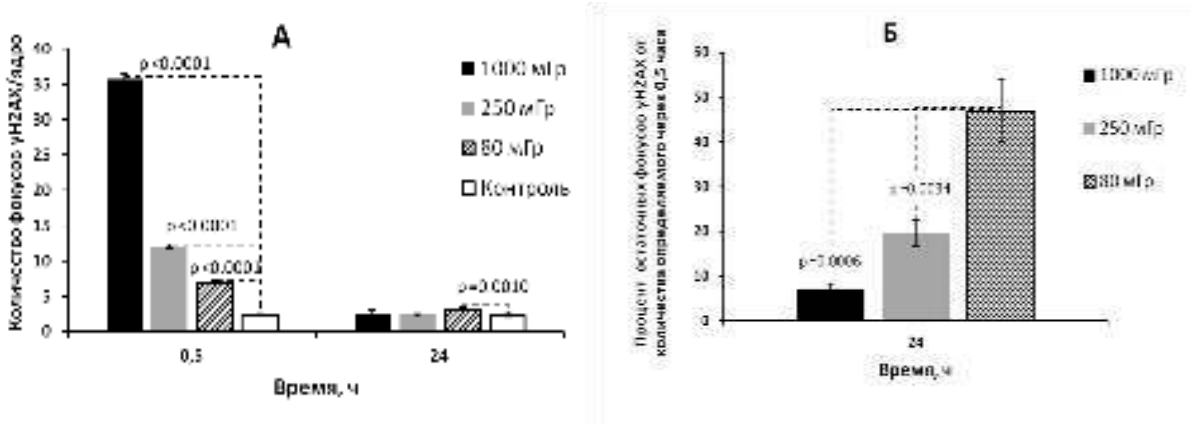


Рисунок 22. Количество и процент «остаточных» фокусов γH2AX в нормальных фибробластах кожи человека после облучения в дозах 1000, 250 и 80 мГр.

А) Сопоставление количества фокусов γH2AX через 0,5 и 24 ч.

Б) Процент «остаточных» фокусов γH2AX через 24 ч от количества, определяемого через 0,5 ч.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что облучение несинхронизированной популяции фибробластов в малой дозе

характеризуется длительным поддержанием повышенного количества фокусов γH2AX по сравнению со средними дозами. При этом процент «остаточных» фокусов γH2AX обратно пропорционально зависел от дозы облучения. Вполне вероятно, что количество фокусов γH2AX, наблюдаемое через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр, объясняется либо неэффективной репарацией ДР ДНК [29], либо репарация ДР ДНК запускается только после достижения определенного порогового количества повреждений ДНК в геноме [104].

Таким образом, облучение фибробластов в малой дозе (80 мГр) характеризуется выявлением через 24 ч большего количества фокусов γH2AX по сравнению с количеством «остаточных» фокусов на этот срок от действия средних доз излучения.

3.3.2. «Остаточные» фокусы pATM

Для расчета процента «остаточных» фокусов pATM через 24 ч использовали соответствующий максимум фосфорилирования ATM для каждой дозы (рисунок 23). Через сутки после облучения в дозах 250 и 1000 мГр процент фокусов pATM составил, соответственно, 33,90±5,08% и 11,46±1,72%, а для малой дозы (80 мГр) - 42,09±6,31% (рисунок 23Б).

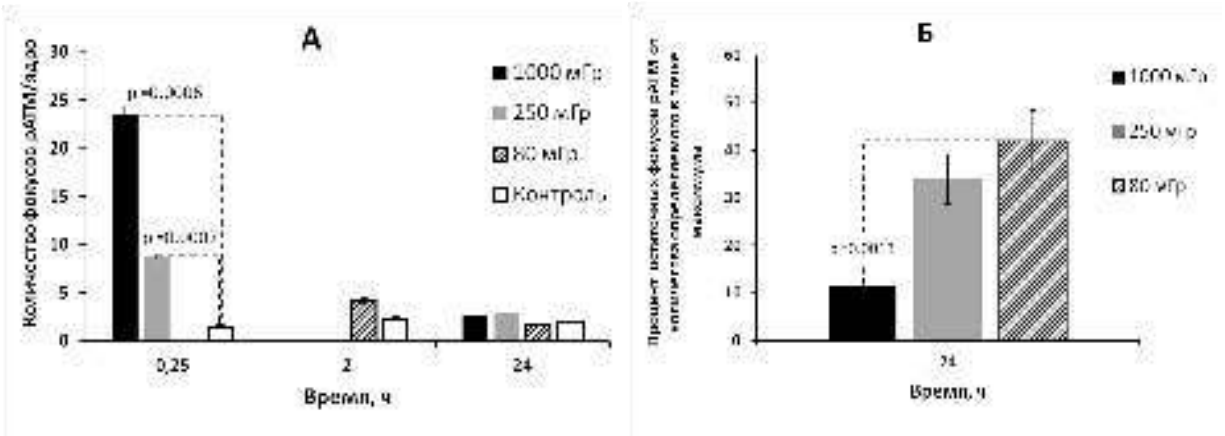


Рисунок 23. Количество и процент «остаточных» фокусов pATM в фибробластах кожи человека после облучения в дозах 1000, 250 и 80 мГр.
А) Сопоставление количества фокусов pATM через 0,25; 2 и 24 ч.

Б) Процент «остаточных» фокусов pATM через 24 ч от максимального количества, определяемого через 15 мин для доз ИИ 1000 и 250 мГр и через 2 ч для дозы 80 мГр.

Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что киназа ATM участвует в длительном поддержании повышенного количества фокусов γH2AX в фибробластах после их облучения в малой дозе. Это участие может быть связано с необходимым присутствием киназы ATM в репарации ДР по механизму гомологичной рекомбинации.

Таким образом, через 24 ч после облучения фибробластов в малой дозе определяется большее процентное содержание «остаточных» фокусов pATM по сравнению с процентом оставшихся фокусов на этот срок после воздействия дозы 1000 мГр.

3.3.3. «Остаточные» фокусы Rad51

Расчет процента «остаточных» фокусов Rad51 через 24 ч после облучения проводили по отношению к максимальным значениям, зарегистрированным через 6 ч (рисунок 24). Установлено, что процент «остаточных» фокусов Rad51 обратно пропорционален дозе облучения (рисунок 24Б). Через 24 ч после облучения фибробластов в дозах 1000, 250 и 80 мГр определялось, соответственно, 15,97±2,40%, 31,63±4,74% и 61,90±9,28% фокусов Rad51 от количества, зарегистрированного через 6 ч.

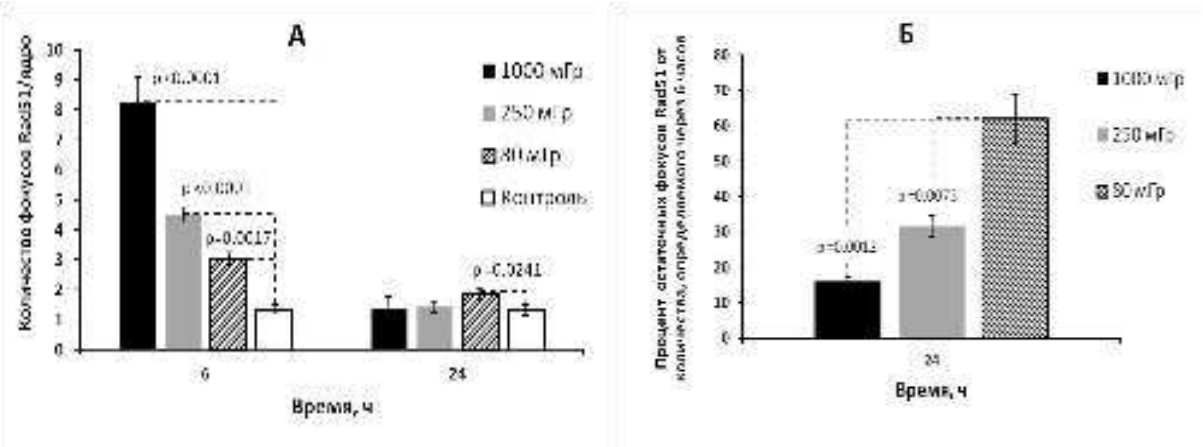


Рисунок 24. Количество и процент «остаточных» фокусов белка Rad51 в нормальных фибробластах кожи человека после облучения в дозах 1000, 250 и 80 мГр.

А) Сопоставление количества фокусов Rad51 через 6 и 24 ч.

Б) Процент «остаточных» фокусов Rad51 через 24 ч от количества, определяемого через 6 ч.

Известно, что фокусы ключевого белка гомологичной рекомбинации Rad51 наблюдаются в ядрах клеток человека в S/G2 фазе [133]. В этой связи результаты исследований позволяют прийти к выводу о том, что длительное поддержание повышенного количества фокусов γH2AX после облучения в малой дозе связано с пролиферативной активностью клеток. В пролиферирующих клетках, можно предположить, более эффективную систему репарации.

3.4. Влияние пролиферативной активности клеток на эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК

Для оценки универсальности и значимости фазы клеточного цикла во время лучевого воздействия предстояло оценить кинетику пострадиационных изменений количества фокусов γH2AX и pATM на фоне изменений пролиферативной активности фибробластов кожи человека.

3.4.1. Влияние пролиферативной активности фибробластов на изменение количества радиационно-индуцированных фокусов γH2AX

Для исследования влияния пролиферативной активности клеток на количество фокусов γH2AX после радиационного воздействия были применены три дозы облучения 80, 250 и 1000 мГр, относящиеся к малому и среднему диапазонам.

В качестве маркера клеточной пролиферации использовали белок Ki67. На рисунке 25 отражены результаты изменения количества фокусов γH2AX в несинхронизированных, пролиферирующих (Ki67+) и покоящихся (Ki67-) клетках в течение 24 ч с момента их облучения.

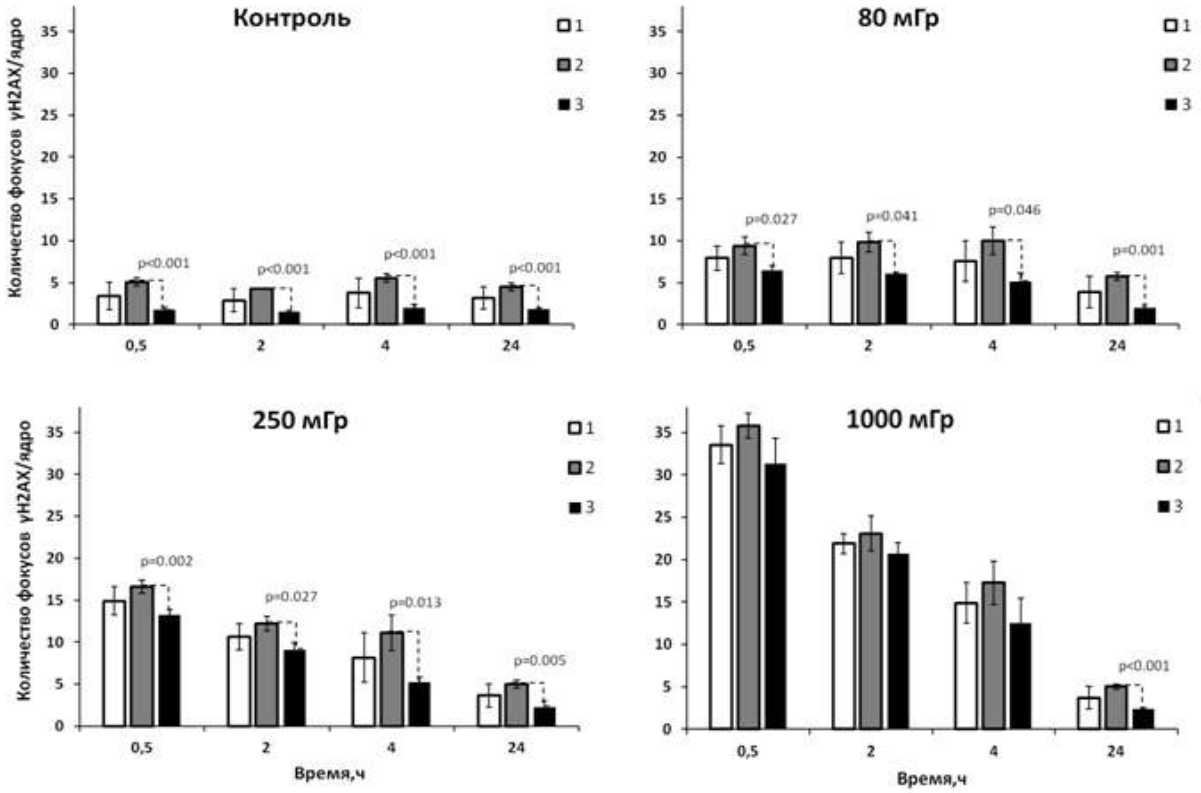


Рисунок 25. Кинетика изменений количества фокусов γH2AX в несинхронизированных (1), пролиферирующих (Ki67+) (2) и покоящихся (Ki67-) (3) фибробластах после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

Изменения количества фокусов γH2AX в пролиферирующих (Ki67+) и покоящихся (Ki67-) фибробластах после их облучения в дозах 250 и 1000 мГр имели сходную динамику уменьшения, достигнув контрольного уровня к 24 ч. При этом количество «остаточных» РИФ γH2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках, статистически достоверно не отличалось от показателей в контроле.

Иная картина наблюдалась после облучения фибробластов в дозе 80 мГр. Количество фокусов γH2AX как в пролиферирующих, так и в покоящихся клетках в течение 4 ч с момента облучения существенно не изменялось и составляло, соответственно, 9,75±1,54 и 5,88±0,83 фокус/клетка. Через 24 ч происходило снижение числа фокусов γH2AX, при этом в пролиферирующих клетках их количество составило 5,73±0,30, а в контроле 4,47±0,47. В непролиферирующих клетках количество фокусов γH2AX не отличалось от контрольных значений.

В контрольных (необлученных) фибробластах фоновое количество фокусов γH2AX в пролиферирующих клетках было выше в 2,7 раза ($p<0.001$), чем в покоящихся (4,75±0,47 и 1,75±0,10, соответственно). После облучения в дозе 1000 мГр статистически достоверные различия между количеством фокусов в пролиферирующих и покоящихся клетках регистрировали через 24 ч. После облучения в дозах 80 и 250 мГр количество фокусов γH2AX в пролиферирующих клетках было выше, чем в покоящихся независимо от времени после их облучения. Более выраженные различия были в клетках, облученных в дозе 80 мГр.

Следует отметить, что нередко исследования выполняются на несинхронизированных культурах, не учитывая различий в количестве фокусов γH2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках. Известно также, что процессы индукции и репарации ДР ДНК в пролиферирующих и покоящихся клетках существенно различаются [134]. Одним из источников ДР ДНК в пролиферирующих клетках является коллапс репликативных вилок в S фазе клеточного цикла [135]. Образующиеся при этом ДР

репарируются только по механизму гомологичной рекомбинации [135, 136], а фосфорилирование гистона H2AX осуществляется преимущественно киназой ATR [55, 137]. По сравнению с некорректным, но быстрым механизмом негомологичного воссоединения концов, по которому репарируется около 80 % радиационно-индуцированных ДР ДНК, ГР является более «корректным», но медленным процессом [8, 134]. Поэтому фокусы γH2AX, возникающие в местах репарации репликативных ДР, имеют другое значение для судьбы клетки.

На следующем этапе исследований был проведен дифференциальный анализ количества фокусов γH2AX в клетках S/G2 и G0/G1 фазах клеточного цикла с использованием белка CENPF, ассоциированного с центромерно-кинетохорным комплексом (рисунок 26). Анализ γH2AX в клетках в M фазе не проводился.

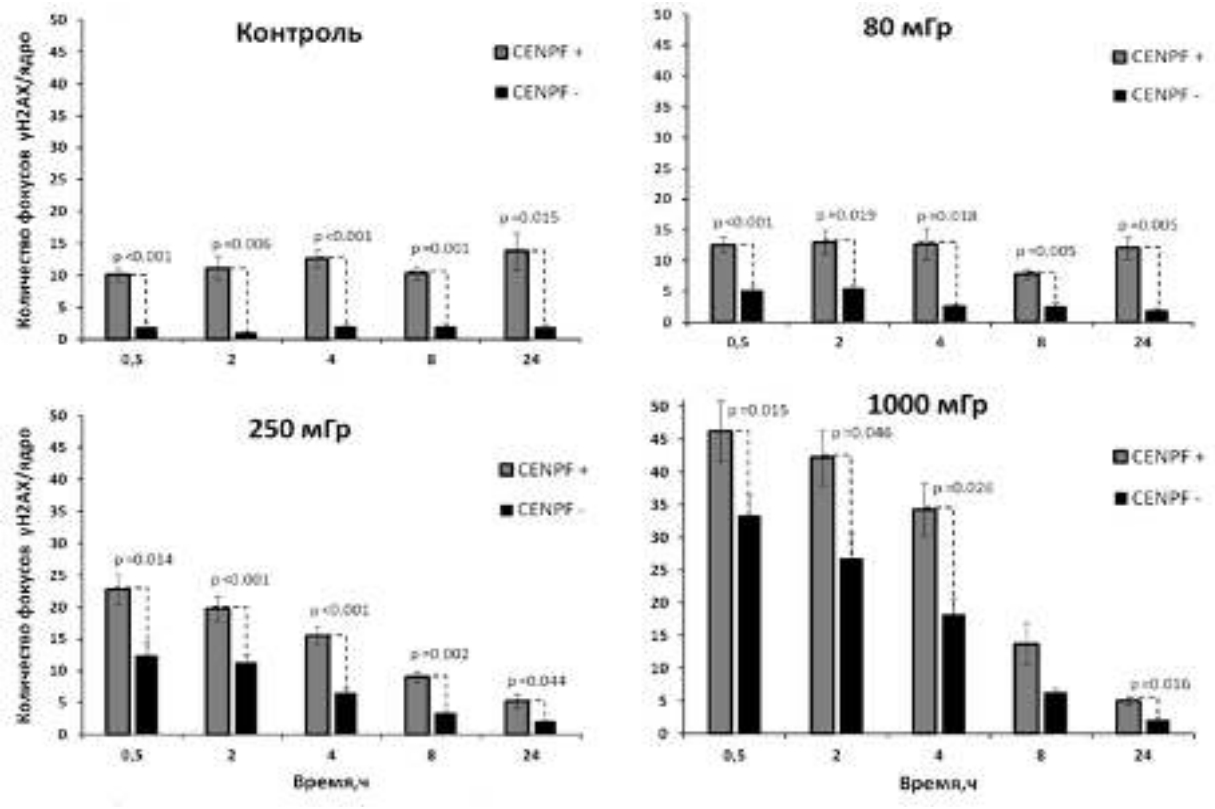


Рисунок 26. Кинетика изменений количества фокусов γH2AX в CENPF позитивных и CENPF негативных фибробластах в течение 24 ч после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

На рисунке 26 отражены результаты исследования CENPF+ и CENPF- клеток, облученных в дозах 80, 250, 1000 мГр, а также необлученного контроля.

В результате исследования было обнаружено, что как в контроле, так и после облучения количество фокусов γH2AX в CENPF+ клетках было выше, чем в CENPF- . В контрольных (необлученных) CENPF+ клетках количество фокусов γH2AX приблизительно в 6,4 раза ($p<0.001$) превышало число фокусов γH2AX в CENPF- клетках (11,59±0,71 и 1,80±0,18, соответственно). В облученных фибробластах количество фокусов γH2AX в CENPF позитивных клетках было выше во все сроки исследования, чем в CENPF негативных клетках в 1,9 раза, 2,2 раза и 3,7 раза соответственно для доз 1000 мГр, 250 мГр и 80 мГр. Выявленная закономерность согласуется с результатом работы MacPhail S.H. et al. (2003) в том, что по мере прогрессии клеток от G1 до S-фазы уровень γH2AX возрастает и в S-фазе проявляет максимальную интенсивность сигнала [30].

Обращает на себя внимание сходная кинетика изменения количества фокусов γH2AX в CENPF+ контрольных и облученных фибробластах в дозе 80 мГр. Количество фокусов γH2AX определялось на одном уровне в течение 24 ч с момента облучения и составило около 12 фокус/клетка, что превышало количество фокусов γH2AX после облучения фибробластов в средних дозах в 2,3 раза (5,27±1,07, $p=0,032$).

В этой связи, провели анализ распределения фибробластов по количеству фокусов γH2AX в несинхронизированных, CENPF+ и CENPF- клетках через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр, по сравнению с дозами 250 и 1000 мГр.

Анализ гетерогенности клеток по количеству фокусов γH2AX, регистрируемых через 24 ч в CENPF+ и CENPF- клетках после облучения во всех дозах исследуемого диапазона, показал одинаковое распределение клеток по количеству фокусов γH2AX в CENPF- клетках независимо от

дозы облучения. Более 90% CENPF- клеток имели до 5 фокусов γH2AX/ядро (рисунок 27).

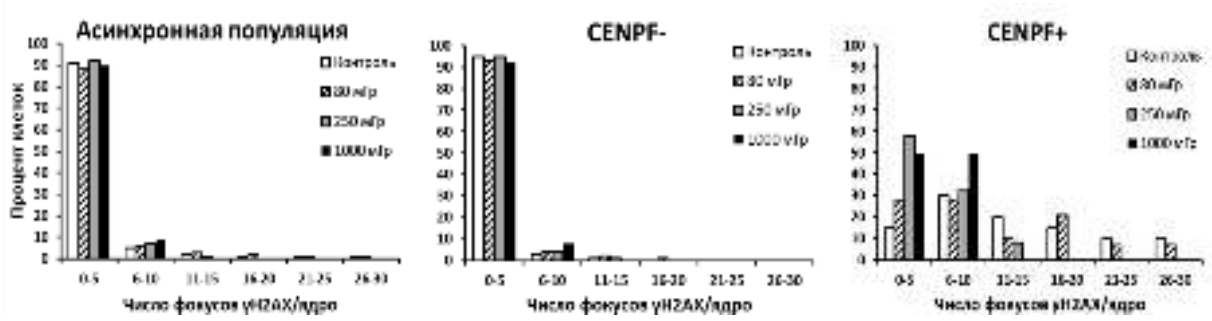


Рисунок 27. Анализ распределения фибробластов по количеству фокусов γH2AX в несинхронизированных, CENPF негативных и CENPF позитивных клетках через 24 ч после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

Иная картина наблюдалась в распределении клеток по количеству фокусов γH2AX в CENPF+ клетках. После воздействия рентгеновского излучения на фибробласты человека в дозе 80 мГр регистрировали практически равномерное распределение клеток по количеству фокусов γH2AX от 0 до 30 фокус/клетка, что коррелировало с распределением клеток в контрольной популяции. После облучения фибробластов в дозах 250 и 1000 мГр более 90% клеток содержали до 10 фокус γH2AX/клетка.

Предположительно, это связано с тем, что после облучения клеток в малых дозах не происходит ареста клеточного цикла, а напротив, наблюдается стимуляция клеточной пролиферации [98, 138, 139] и клетки продолжают движение по клеточному циклу.

Чтобы проверить это предположение дополнительно был проведен подсчет доли CENPF+ клеток через 24 ч после воздействия ИИ.

3.4.2. Влияние малой и средних доз ионизирующего излучения на изменение через 24 ч процентного соотношения клеток в разных фазах клеточного цикла

Результаты подсчета доли CENPF+ клеток через 24 ч после воздействия ИИ в дозах 80, 250 и 1000 мГр представлены на рисунке 28.

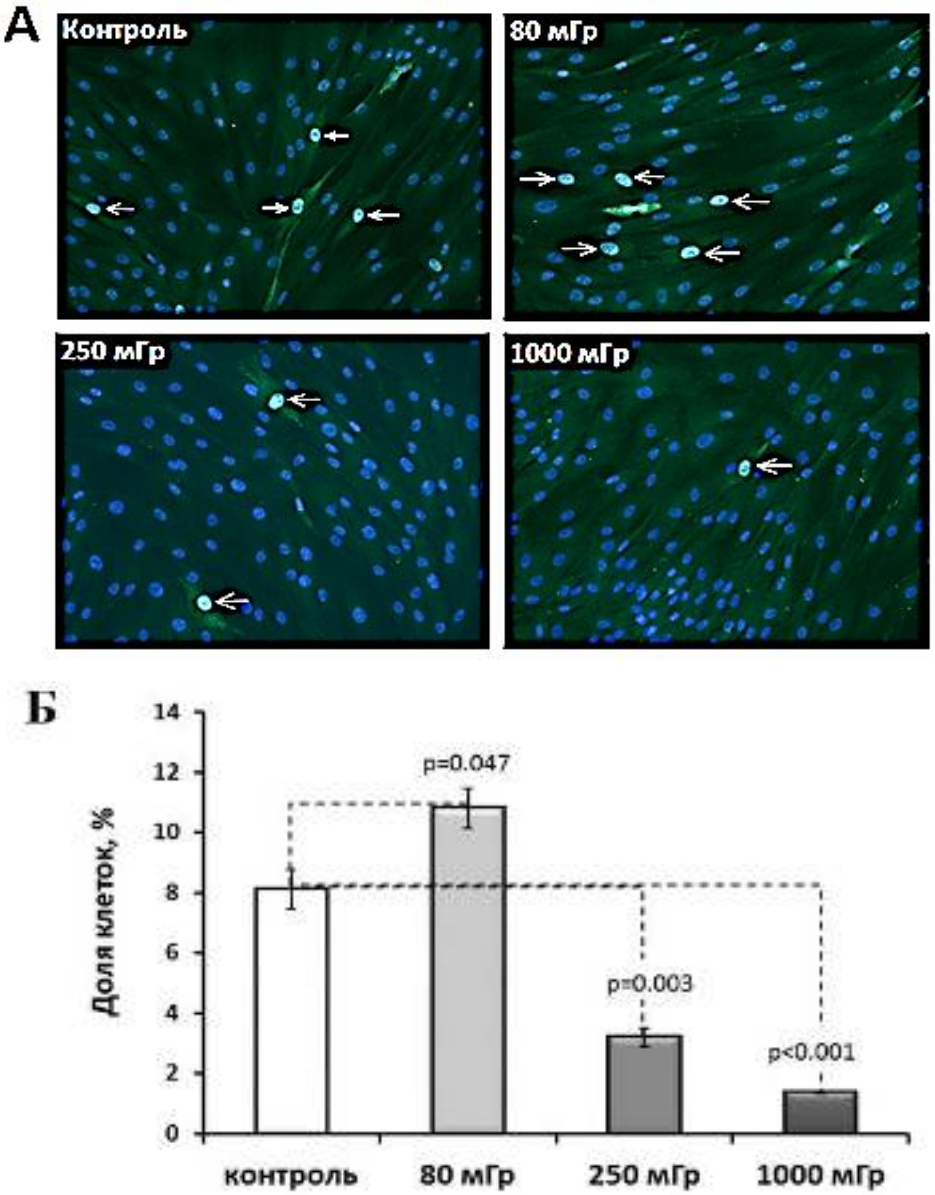


Рисунок 28. Анализ CENPF позитивных клеток через 24 ч после рентгеновского излучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

А) Микрофотографии фибробластов, окрашенных флуоресцентно-меченными антителами к белку CENPF (CENPF позитивные клетки указаны стрелками).

Б) Доля (%) CENPF позитивных клеток.

Было показано, что облучение в малых дозах стимулирует клеточную пролиферацию и увеличивает долю CENPF+ клеток приблизительно на 25 %, а облучение в средних дозах вызывает их снижение (рисунок 28). С уверенностью можно предполагать, что этот эффект связан с арестом клеточного цикла, как это было показано в работах Fournier C. et al. и Tenhumberg S. et al. [140, 141]. Кроме того, обнаруженное в данном исследовании и опубликованное в работе [128] увеличение доли CENPF+ клеток после облучения фибробластов в дозе 80 мГр вполне объясняет феномен длительного поддержания повышенного количества фокусов γH2AX после облучения клеток в дозах 20-80 мГр, выявленное нами ранее [126].

Проведенные исследования показали, что изменение доли клеток в S/G2 фазах является критическим и отражается на подсчете среднего количества фокусов γH2AX в несинхронизированных клеточных популяциях, увеличивая их количество в клетках, облученных в малых дозах и занижая в клетках, облученных в средних дозах. Этот результат особенно важен, поскольку анализ γH2AX в качестве биологического маркера ДР ДНК нашел широкое применение в различных биологических исследованиях, например, в радиационной биодозиметрии [13], оценке индивидуальной радиочувствительности [142], тестировании лекарственных и химиотерапевтических препаратов [143-145], оценке влияния генотоксических агентов окружающей среды [146], изучении механизмов старения [112] и т.д.

Таким образом, проведенное исследование дает основание заключить, что необходимо проводить детальный анализ изменения количества фокусов γH2AX с учетом пролиферативной активности и фаз клеточного цикла, а также оценкой изменений распределения популяции по стадиям клеточного цикла.

3.4.3. Влияние пролиферативной активности фибробластов на изменение количества радиационно-индуцированных фокусов pATM

Оценку изменения количества фокусов pATM в зависимости от пролиферативной активности клеток проводили с использованием белка CENPF после облучения фибробластов в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

При всех примененных дозах облучения максимальные значения фокусов pATM определялись через 0,5 ч после лучевого воздействия. Убыль количества фокусов pATM происходила в течение 24 ч и приближалась или достигала уровня контроля 1,2±0,2 фокус/клетка (рисунок 29).

Максимальные различия между количеством фокусов pATM в CENPF+ и в CENPF- клетках установлены в интервале 4-8 ч, то есть во время медленной фазы репарации.

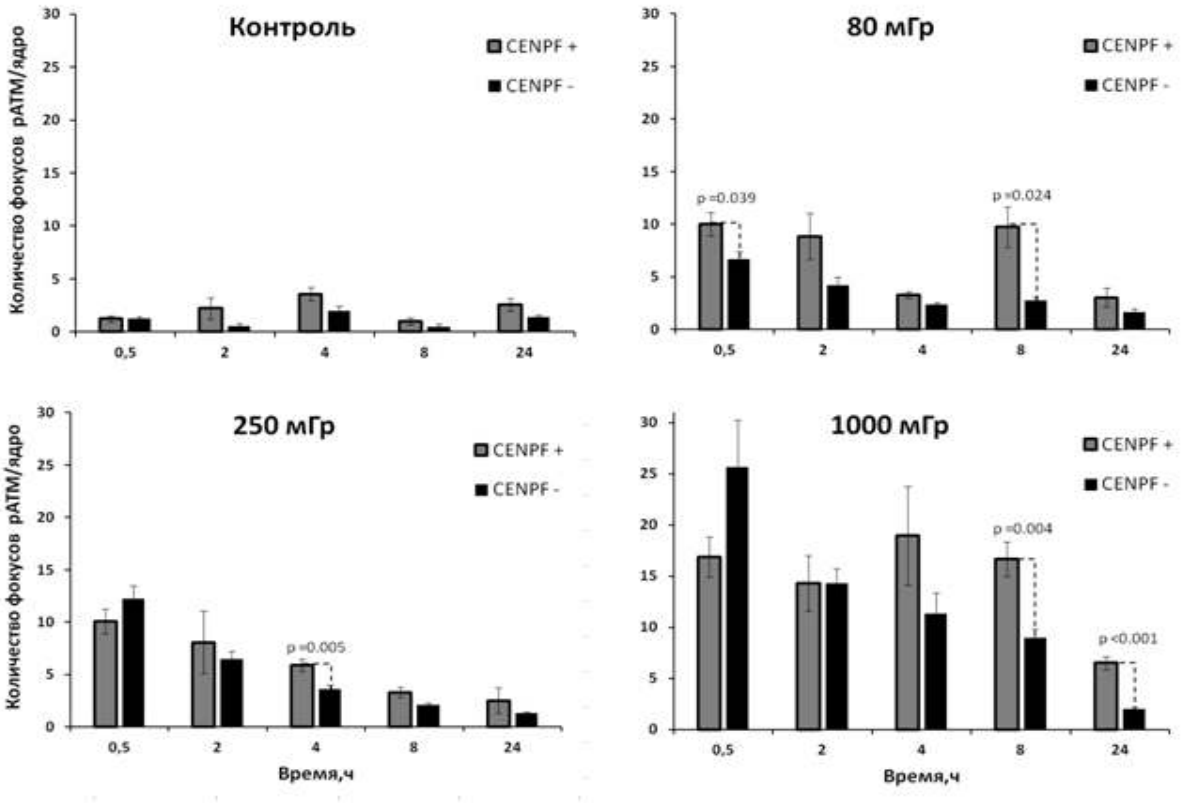


Рисунок 29. Изменения количества фокусов pATM в CENPF негативных и CENPF позитивных фибробластах человека в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

Полученные данные согласуются с результатами Beucher A. (2009) о необходимом участии ATM в процессе гомологичной рекомбинации [93].

Таким образом, пролиферативная активность клеток оказывает влияние на скорость деградации фокусов pATM.

Влияние пролиферативной активности фибробластов на изменения количества РИФ γH2AX и pATM является, по-видимому, дополнительным фактором, а определяющим остается доза лучевого воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена важной проблеме – радиационному повреждению ДНК и механизмам репарации этих нарушений. Речь идет о часто возникающих при воздействии ионизирующих излучений двойных разрывах цепи ДНК и восстановлении ее структуры - благодаря эволюционно сформировавшемуся комплексу белков.

Для удобства изложения полученные результаты описываются в заключении в трех разделах:

а. Радиационно-индуцированные двунитевые разрывы ДНК

б. Пострадиационное восстановление структуры ДНК от двойных разрывов

в. «Остаточные» фокусы – последствия пострадиационного восстановления

а. Воздействие рентгеновского излучения в малых (20, 40 и 80 мГр) и средних дозах (160, 250, 500 и 1000 мГр) вызывает в фибробластах двойные разрывы цепей ДНК. В областях хроматина, прилегающего к двунитевым разрывам, фосфорилируется гистон H2AX. Причем, для редкоионизирующего излучения принято считать, что один фокус γH2AX равен одному ДР ДНК. При всех примененных дозах облучения максимум фосфорилирования H2AX, прямо пропорциональный дозам, установлен в течение первого часа после лучевого воздействия. При дозах 250 и 1000 мГр максимум составлял, соответственно, 21 и 36 фокус/ядро. При дозе 80 мГр установлено 7 фокус/ядро. Прямо пропорциональная зависимость количества фокусов γH2AX от дозы облучения подтверждена также в пролиферирующих фибробластах. В облученных клетках количество фокусов γH2AX повышается в 1,5-5 раз в зависимости от фазы клеточного цикла.

б. Увеличение времени инкубации клеток после облучения до 2 ч приводит к уменьшению количества фокусов γH2AX, индуцированных радиацией в средних дозах. За это время количество фокусов γH2AX в клетках, облученных в малых дозах, не изменяется. Уменьшение количества фокусов γH2AX, то есть дефосфорилирование белка H2AX, является проявлением репарации ДНК от ДР. Процесс репарации ДР ДНК после воздействия средних и малых доз ИИ происходил в две фазы: быструю и медленную, но различался по срокам их начала, окончания и темпу.

После облучения фибробластов в средних дозах деградация фокусов γH2AX начинается через 30 мин и прекращается в течение первых суток. В клетках, облученных в малых дозах, деградация фокусов γH2AX начинается позднее, через 2 ч и не завершается к окончанию первых суток.

Поскольку в фосфорилировании гистона H2AX основное участие принимает киназа ATM, определение ее участия в репарации ДР ДНК после воздействия средних и малых доз представлялось необходимым. При анализе количества фокусов pATM выявились различия в действии средних и малых доз рентгеновского излучения. Максимальные количества фокусов pATM появляются в разное время: через 5-15 мин после воздействия средних доз и через 2 ч после облучения в малых дозах. Наблюдаемый в это время процесс солокализации фокусов γH2AX и pATM свидетельствует о функциональной инертности pATM, то есть об ATM-независимом характере фосфорилирования H2AX в первые 30 мин после облучения и о начале ATM-зависимого фосфорилирования H2AX через 8 ч после лучевого воздействия, обеспечивающего эффективную гомологичную рекомбинацию.

Количество основного белка гомологичной рекомбинации Rad51 в нормальных фибробластах человека изменяется после рентгеновского облучения как в малых, так и в средних дозах синхронно: достоверное увеличение количества фокусов регистрируется через 2 ч после воздействия, а максимальные количества определяются через 6 ч.

Количества возникающих фокусов Rad51 пропорциональны дозам излучения.

Анализ количества фокусов Rad51 позволил выявить, что именно гомологичная рекомбинация вызывает повышенный уровень фокусов γH2AX и pATM через 24 ч после облучения клеток. Полученные данные свидетельствуют о более «корректной» репарации «остаточных» повреждений ДНК, которые были вызваны малыми дозами ИИ.

в. Количество фокусов γH2AX существенно уменьшается через 24 ч после лучевого воздействия и в зависимости от дозы облучения (1000, 250 и 80 мГр) составляет по отношению к максимальным значениям, зафиксированным через 0,5 ч, соответственно: 7%, 20% и 47%. Аналогичные количественные изменения через 24 ч после облучения в средних и малых дозах претерпели и фокусы pATM и Rad51. Их процентное содержание по отношению к указанным выше дозам рентгеновского излучения составило соответственно: 11%, 34% и 42% для pATM и 16%, 32% и 62% для Rad51. В результате, в фибробластах через 24 ч после воздействия малых доз определяется более высокое процентное содержание фокусов репарации ДНК по сравнению с показателями для доз среднего диапазона. Полученные результаты позволяют прийти к основному положению диссертации: длительное поддержание повышенного количества фокусов γH2AX после облучения в малой дозе может быть связано только с пролиферативной активностью клеток. В пролиферирующих клетках осуществляется эффективная система репарации. Контролируемая дифференцировка клеточного цикла подтверждает, что облучение фибробластов на стадии S/G2 в малой дозе (80 мГр) не только не вызывает ареста клеточного цикла, но способствует стимуляции пролиферации, что подтверждается прохождением клеток по циклу.

Выявленная закономерность обосновывает необходимость для избежания погрешностей в интерпретации результатов количества фокусов γH2AX проводить их анализ с учетом пролиферативной активности клеток и фаз клеточного цикла.

Основное значение настоящей работы состоит в доказательстве на модели изолированных клеток отсутствия признаков отрицательного воздействия редкоионизирующего излучения в малых дозах (по классификации UNSCEAR [147]) на фибробласты кожи человека.

ВЫВОДЫ

1. Установлена линейная зависимость между количеством фокусов γH2AX (маркер двунитевых разрывов ДНК) и дозой рентгеновского излучения (20-1000 мГр) в несинхронизированных, покоящихся (Ki67-), пролиферирующих (Ki67+) и находящихся в S/G2 фазах (CENPF+) популяциях фибробластов кожи человека.
2. В пролиферирующих (Ki67+) и находящихся в S/G2 фазах (CENPF+) контрольных и облученных клетках число фокусов γH2AX и pATM выше, чем в непролиферирующих фибробластах (Ki67-).
3. Процесс деградации фокусов γH2AX, заключающийся в дефосфорилировании гистона H2AX, начинается через 30 мин после облучения фибробластов в средних дозах и снижается в течение суток до уровня необлученного контроля. Деградация фокусов γH2AX в фибробластах, облученных в малых дозах, начинается через 2 ч и не завершается к 24 ч.
4. После облучения несинхронизированных фибробластов человека в малой дозе установлено длительное присутствие повышенного количества фокусов γH2AX, pATM и Rad51, которое обусловлено стимуляцией пролиферативной активности клеток. Дозы ИИ, относящиеся к диапазону малых (20-80 мГр) в отличие от диапазона средних доз (160-1000 мГр) не тормозят прохождения фибробластов по фазам клеточного цикла и увеличивают долю клеток в пролиферирующем пуле.
5. Репарация двунитевых разрывов ДНК, индуцированных облучением в малых дозах, происходит более «корректно», чем после облучения в средних дозах. Относительный вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после облучения клеток снижается с 18% до 9% при увеличении дозы облучения от 20 до 1000 мГр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

53BP1 (p53 binding protein)	p53-связывающий белок
ГР	Гомологичная рекомбинация
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНК-ПК	ДНК-зависимая протеин киназа
ДР ДНК	Двунитевой разрыв ДНК
ИИ	Ионизирующее излучение
НГСК	Негомологичное соединение концов
РИФ	Радиационно-индуцированные фокусы
ATM (ataxia telangiectasia mutated)	Продукт гена, связанного с наследственным синдромом атаксии-телеангиэктазии
ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related)	ATM- и Rad3-родственная киназа
BLM (Bloom syndrome protein)	Ген BLM, связанный с синдромом Блума
BRCA1 (Breast cancer susceptibility protein 1)	Ген восприимчивости рака молочной железы 1
BRCA2 (Breast cancer susceptibility protein 1)	Ген восприимчивости рака молочной железы 2
CENPF (centromere protein F)	Белок F, связывающийся с центромерой
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Питательная среда Игла в модификации Дюльбекко
DSBR –путь (Repair of DNA double-strand breaks)	Путь репарации двунитевых разрывов ДНК
γH2AX	Фосфорилированная форма корового гистона H2AX

KAP-1 (Kinesin associated protein)	Белок, ассоциированный с кинезином
MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1)	Медиаторный белок 1, участвующий в контроле клеточного цикла при повреждении ДНК
MRE11 (meiotic recombination 11 homolog protein)	Белок гомолог мейотической рекомбинации 11
MRN	Репаративный комплекс белков **M**RE11, **R**AD50 и **N**BS1, осуществляющий репарацию ДР ДНК
NBS1 (**N**ijmegen **B**reakage **S**yndrome 1)	Белок, кодируемый геном NBS, мутация в котором ассоциирована с наследственным заболеванием - синдром хромосомной неустойчивости Неймегена
PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-polymerase-1)	Поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1
PCNA (Proliferating cell nuclear antigen)	Ядерный антиген пролиферирующих клеток
Rad50	Белок репарации ДНК, кодируемый геном RAD50
Rad51	Ключевой белок ГР, продукт гена RAD51
RPA (Replication protein A)	Фактор репликации А
SDSA –путь (synthesis-dependent strand annealing)	Синтез-зависимый отжиг цепей
Top IIIa	ДНК-топоизомераза III
UNSCEAR (The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation)	НКДАР (Научный комитет Организации Объединенных Наций по действию атомной радиации)
XLF (XRCC4-like factor)	Белок, стимулирующий лигазную

	активность XRCC4 и Ku при НГСК
XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1)	Рентгеноструктурный кросс - комплементарный белок 1
XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4)	Рентгеноструктурный кросс - комплементарный белок 4

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузин, А. М. Проблема малых доз и идея гормезиса в радиобиологии / А. М. Кузин // Радиобиология. – 1991. – Т. 31, № 1. – С. 16-21.

2. Филиппович, И. В. Феномен адаптивного ответа клеток в радиобиологии / И. В. Филиппович // Радиобиология. – 1991. – Т. 31, № 6. – С. 803-813.

3. Olivieri, G. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine / G. Olivieri, J. Bodycote, S. Wolff // // Science. – 1984. – V. 223, № 4636. – P. 594-597.

4. Brenner, D. J. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know / D. J. Brenner, R. Doll, D. T. Goodhead, E. J. Hall, C. E. Land, J. B. Little, J. H. Lubin, D. L. Preston, R. J. Preston, J. S. Puskin, E. Ron, R. K. Sachs, J. M. Samet, R. B. Setlow, M. Zaider // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100, № 24. – P. 13761-13766.

5. Han, M. A. Diagnostic X-Ray Exposure and Thyroid Cancer Risk: Systematic Review and Meta-Analysis / M. A. Han, J. H. Kim // Thyroid. – 2018. – V. 28, № 2. – P. 220-228.

6. UNSCEAR. Sources and Effects of Ionising Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation Report to the General Assembly with Scientific Annexes // United Nations, New York, NY. – 2000.

7. Ward, J. F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability / J. F. Ward // Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. – 1988. – V. 35. – P. 95-125.

8. Goodarzi, A. A. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax / A. A. Goodarzi, P. Jeggo, M. Lobrich // DNA Repair (Amst). – 2010. – V. 9, № 12. – P. 1273-1282.

9. Mladenov, E. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways / E. Mladenov, G. Iliakis // Mutat Res. – 2011. – V. 711, № 1-2. – P. 61-72.

10. Заднепрянец, М. Г. Закономерности формирования и элиминации γH2AX/53BP1 фокусов при действии γ-квантов и ускоренных тяжелых ионов / М. Г. Заднепрянец, А. В. Борейко, Т. С. Буланова, Л. Йежкова, Е. А. Красавин, Е. А. Куликова, Е. В. Смирнова, М. Фальк, И. Фалькова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, № 3. – С. 229-237.

11. Martin, O. A. Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity / O. A. Martin, A. Ivashkevich, S. Choo, L. Woodbine, P. A. Jeggo, R. F. Martin, P. Lobachevsky // DNA Repair (Amst). – 2013. – V. 12, № 10. – P. 844-855.

12. Sollazzo, A. Live Dynamics of 53BP1 Foci Following Simultaneous Induction of Clustered and Dispersed DNA Damage in U2OS Cells / A. Sollazzo, B. Brzozowska, L. Cheng, L. Lundholm, H. Scherthan, A. Wojcik // Int J Mol Sci. – 2018. – V. 19, № 2.

13. Garty, G. The RABIT: a rapid automated biodosimetry tool for radiological triage / G. Garty, Y. Chen, A. Salerno, H. Turner, J. Zhang, O. Lyulko, A. Bertucci, Y. Xu, H. Wang, N. Simaan, G. Randers-Pehrson, Y. L. Yao, S. A. Amundson, D. J. Brenner // Health Phys. – 2010. – V. 98, № 2. – P. 209-217.

14. Васильев, С. А. Фоновое количество фокусов γH2AX в клетках человека как фактор индивидуальной радиочувствительности / С. А. Васильев, А. И. Величевская, Т. В. Вишневская, А. А. Беленко, О.В. Грибова, М.Б. Плаксин, Ж.А. Старцева, И.Н. Лебедев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 402-410.

15. Watson, J. D. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid / J. D. Watson, F. H. Crick // Nature. – 1953. – V. 171, № 4356. – P. 737-738.

16. Watson, J. D. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid / J. D. Watson, F. H. Crick // Nature. – 1953. – V. 171, № 4361. – P. 964-967.

17. Ahnstrom, G. Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution / G. Ahnstrom, K. Erixon // Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. – 1973. – V. 23, № 3. – P. 285-289.

18. Blocher, D. DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of x-rays. I. Determination of induced breaks by centrifugation at reduced speed / D. Blocher // Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. – 1982. – V. 42, № 3. – P. 317-328.

19. Schwartz, D. C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis / D. C. Schwartz, C. R. Cantor // Cell. – 1984. – V. 37, № 1. – P. 67-75.

20. Ostling, O. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells / O. Ostling, K. J. Johanson// Biochem Biophys Res Commun. – 1984. – V. 123, № 1. – P. 291-298.

21. Sedelnikova, O. A. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody / O. A. Sedelnikova, E. P. Rogakou, I. G. Panyutin, W. M. Bonner // Radiat Res. – 2002. – V. 158, № 4. – P. 486-492.

22. Rogakou, E. P., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 / E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, W. M. Bonner // J Biol Chem. – 1998. – V. 273, № 10. – P. 5858-5868.

23. Pantazis, P. Quantitative determination of histone modification. H2A acetylation and phosphorylation / P. Pantazis, W. M. Bonner // J Biol Chem. – 1981. – V. 256, № 9. – P. 4669-4675.

24. Ikura, T. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics / T. Ikura, S. Tashiro, A. Kakino, H. Shima, N. Jacob, R. Amunugama, K. Yoder, S. Izumi, I. Kuraoka, K. Tanaka, H. Kimura, M. Ikura, S. Nishikubo, T. Ito, A. Muto, K. Miyagawa, S. Takeda, R. Fishel, K. Igarashi, K. Kamiya // Mol Cell Biol. – 2007. – V. 27, № 20. – P. 7028-7040.

25. Chew, Y. C. Lysine residues in N-terminal and C-terminal regions of human histone H2A are targets for biotinylation by biotinidase / Y. C. Chew, G.

Camporeale, N. Kothapalli, G. Sarath, J. Zempleni // J Nutr Biochem. – 2006. – V. 17, № 4. – P. 225-233.

26. Xiao, A. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity / A. Xiao, H. Li, D. Shechter, S. H. Ahn, L. A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage, S. Ishibe-Murakami, B. Wang, P. Tempst, K. Hofmann, D. J. Patel, S. J. Elledge, C. D. Allis // Nature. – 2009. – V. 457, № 7225. – P. 57-62.

27. Pinto, D. M. Structure and function of histone H2AX / D. M. Pinto, A. Flaus // Subcell Biochem. – 2010. – V. 50. – P. 55-78.

28. Rogakou, E. P. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo / E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W. M. Bonner // J Cell Biol. – 1999. – V. 146, № 5. – P. 905-916.

29. Rothkamm, K. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses / K. Rothkamm, M. Lobrich // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100, № 9. – P. 5057-5062.

30. MacPhail, S. H. Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells / S. H. MacPhail, J. P. Banath, Y. Yu, E. Chu, P. L. Olive // Radiat Res. – 2003. – V. 159, № 6. – P. 759-767.

31. Bonner, W. M. GammaH2AX and cancer / W. M. Bonner, C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, O.A. Sedelnikova, S. Solier, Y. Pommier // Nat Rev Cancer. – 2008. – V. 8, № 12. – P. 957-967.

32. Wilson, P. F. Inter-individual variation in DNA double-strand break repair in human fibroblasts before and after exposure to low doses of ionizing radiation / P. F. Wilson, P. B. Nham, S.S. Urbin, J. M. Hinz, I. M. Jones, L. H. Thompson // Mutat Res. – 2010. – V. 683, № 1-2. – P. 91-97.

33. Nakamura, A. J. Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence / A. J. Nakamura, Y. J. Chiang, K. S. Hathcock, I. Horikawa, O. A. Sedelnikova, R. J. Hodes, W. M. Bonner // Epigenetics Chromatin. – 2008. – V. 1, № 1. – P. 6.

34. Herbig, U. Cellular senescence in aging primates / U. Herbig, M. Ferreira, L. Condel, D. Carey, J. M. Sedivy // Science. – 2006. – V. 311, № 5765. – P. 1257.

35. Nakamura, A. J. Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells / A. J. Nakamura, C. E. Redon, W. M. Bonner, O. A. Sedelnikova// Aging (Albany NY). – 2009. – V. 1, № 2. – P. 212-218.

36. Markova, E. Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival / E. Markova, N. Schultz, I. Y. Belyaev // Int J Radiat Biol. – 2007. – V. 83, № 5. – P. 319-329.

37. Rogakou, E. P. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139 / E. P. Rogakou, W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier, W. M. Bonner // J Biol Chem. – 2000. – V. 275, № 13. – P. 9390-9395.

38. Solier, S. The nuclear gamma-H2AX apoptotic ring: implications for cancers and autoimmune diseases / S. Solier, Y. Pommier // Cell Mol Life Sci. – 2014. – V. 71, № 12. – P. 2289-2297.

39. Solier, S. Heat shock protein 90alpha (HSP90alpha), a substrate and chaperone of DNA-PK necessary for the apoptotic response / S. Solier, K.W. Kohn, B. Scroggins, W. Xu, J. Trepel, L. Neckers, Y. Pommier // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – V. 109, № 32. – P. 12866-12872.

40. Costes, S. V. Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts / S.V. Costes, A. Boissiere, S. Ravani, R. Romano, B. Parvin, M. H. Barcellos-Hoff // Radiat Res. – 2006. – V. 165, № 5. – P. 505-515.

41. McManus, K. J. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells / K. J. McManus, M. J. Hendzel // Mol Biol Cell. – 2005. – V. 16, № 10. – P. 5013-5025.

42. Lobrich, M. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization / M. Lobrich, A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A. A. Goodarzi, O. Barton, P. A. Jeggo // Cell Cycle. – 2010. – V. 9, № 4. – P. 662-669.

43. Asaithamby, A. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation / A. Asaithamby, D. J. Chen // Nucleic Acids Res. – 2009. – V. 37, № 12. – P. 3912-3923.

44. Mahrhofer, H. Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation / H. Mahrhofer, S. Burger, U. Oppitz, M. Flentje, C. S. Djuzenova // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 2006. – V. 64, № 2. – P. 573-580.

45. Neumaier, T. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells / T. Neumaier, J. Swenson, C. Pham, A. Polyzos, A. T. Lo, P. Yang, J. Dyball, A. Asaithamby, D. J. Chen, M. J. Bissell, S. Thalhammer, S. V. Costes // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – V. 109, № 2. – P. 443-448.

46. Masuda, Y. Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity / Y. Masuda, K. Kamiya // Int J Hematol. – 2012. – V. 95, № 3. – P. 239-245.

47. Durocher, D. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? / D. Durocher, S. P. Jackson // Curr Opin Cell Biol. – 2001. – V. 13, № 2. – P. 225-31.

48. Paull, T. T. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage / T. T. Paull, E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, W. M. Bonner // Curr Biol. – 2000. – V. 10, № 15. – P. 886-895.

49. Burma, S. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks / S. Burma, B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D. J. Chen // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, № 45. – P. 42462-42467.

50. Stucki, M. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes / M. Stucki, S. P. Jackson // DNA Repair (Amst). – 2006. – V. 5, № 5. – P. 534-543.

51. Peng, Y. Deficiency in the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase causes down-regulation of ATM / Y. Peng, R.G. Woods, H. Beamish, R. Ye, S.P. Lees-Miller, M.F. Lavin, J.S. Bedford // Cancer Res. – 2005. – V. 65, № 5. – P. 1670-1677.

52. Shrivastav, M. DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair / M. Shrivastav, C. A. Miller, L. P. De Haro, S. T. Durant, B. P. Chen, D. J. Chen, J. A. Nickoloff // DNA Repair (Amst). – 2009. – V. 8, № 8. – P. 920-929.

53. An, J. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression / J. An, Y. C. Huang, Q. Z. Xu, L. J. Zhou, Z. F. Shang, B. Huang, Y. Wang, X. D. Liu, D. C. Wu, P. K. Zhou // BMC Mol Biol. – 2010. – V. 11. – P. 18.

54. Flassig, R. J. Experimental design, validation and computational modeling uncover DNA damage sensing by DNA-PK and ATM / R. J. Flassig, G. Maubach, C. Tager, K. Sundmacher, M. Naumann // Mol Biosyst. – 2014. – V. 10, № 7. – P. 1978-1986.

55. Ward, I. M. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress / I. M. Ward, J. Chen // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, № 51. – P. 47759-47762.

56. Blackford, A. N. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response / A. N. Blackford, S. P. Jackson // Mol Cell. – 2017. – V. 66, № 6. – P. 801-817.

57. Abramenkovs, A. Measurement of DNA-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Using Flow Cytometry Provides a Reliable Estimate of DNA Repair Capacity / A. Abramenkovs, B. Stenerlow // Radiat Res. – 2017. – V. 188, № 6. – P. 597-604.

58. Suzuki, K. Qualitative and quantitative analysis of phosphorylated ATM foci induced by low-dose ionizing radiation / K. Suzuki, H. Okada, M. Yamauchi, Y.

Oka, S. Kodama, M. Watanabe // Radiat Res. – 2006. – V. 165, № 5. – P. 499-504.

59. Bakkenist, C. J. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation / C. J. Bakkenist, M. B. Kastan // Nature. – 2003. – V. 421, № 6922. – P. 499-506.

60. Kitagawa, R. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway / R. Kitagawa, M. B. Kastan // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. – 2005. – V. 70. – P. 99-109.

61. Yamauchi, M. Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling / M. Yamauchi, Y. Oka, M. Yamamoto, K. Niimura, M. Uchida, S. Kodama, M. Watanabe, I. Sekine, S. Yamashita, K. Suzuki // DNA Repair (Amst). – 2008. – V. 7, № 3. – P. 405-417.

62. Enns, L. Association of ATM activation and DNA repair with induced radioresistance after low-dose irradiation / L. Enns, A. Rasouli-Nia, M. Hendzel, B. Marples, M. Weinfeld // Radiat Prot Dosimetry. – 2015. – V. 166, № 1-4. – P. 131-136.

63. Mahaney, B. L. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining / B. L. Mahaney, K. Meek, S. P. Lees-Miller // Biochem J. – 2009. – V. 417, № 3. – P. 639-650.

64. Wang, M. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways / M. Wang, W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang, G. Iliakis // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 34, № 21. – P. 6170-6182.

65. Paul, K. DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates / K. Paul, M. Wang, E. Mladenov, A. Bencsik-Theilen, T. Bednar, W. Wu, H. Arakawa, G. Iliakis // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 3. – P. e59505.

66. Hochegger, H. Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells / H. Hochegger, D. Dejsuphong, T. Fukushima, C. Morrison, E. Sonoda, V. Schreiber, G. Y. Zhao, A. Saberi, M.

Masutani, N. Adachi, H. Koyama, G. de Murcia, S. Takeda // EMBO J. – 2006. – V. 25, № 6. – P. 1305-1314.

67. Ciccia, A. The DNA damage response: making it safe to play with knives/ A. Ciccia, S. J. Elledge // Mol Cell. – 2010. – V. 40, № 2. – P. 179-204.

68. Sung, P. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions / P. Sung, H. Klein // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2006. – V. 7, № 10. – P. 739-750.

69. Andersen, S. L. Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes / S. L. Andersen, J. Sekelsky // Bioessays. – 2010. – V. 32, № 12. – P. 1058-1066.

70. Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells / G. Iliakis // Bioessays. – 1991. – V. 13, № 12. – P. 641-648.

71. Kruger, I. Enhanced fidelity for rejoining radiation-induced DNA double-strand breaks in the G2 phase of Chinese hamster ovary cells / I. Kruger, K. Rothkamm, M. Lobrich // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32, № 9. – P. 2677-2684.

72. Kodym, R. Determination of radiation-induced DNA strand breaks in individual cells by non-radioactive labelling of 3' OH ends / R. Kodym, E. Horth // Int J Radiat Biol. – 1995. – V. 68, № 2. – P. 133-139.

73. Iliakis, G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation / G. Iliakis, H. Wang, A. R. Perrault, W. Boecker, B. Rosidi, F. Windhofer, W. Wu, J. Guan, G. Terzoudi, G. Pantelias // Cytogenet Genome Res. – 2004. – V. 104, № 1-4. – P. 14-20.

74. Kakarougkas, A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism / A. Kakarougkas, P. A. Jeggo // Br J Radiol. – 2014. – V. 87, № 1035. – P. 20130685.

75. Sonoda, E. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair / E. Sonoda, H.

Hochegger, A. Saberi, Y. Taniguchi, S. Takeda // DNA Repair (Amst). – 2006. – V. 5, № 9-10. – P. 1021-1029.

76. Rothkamm, K. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle / K. Rothkamm, I. Kruger, L. H. Thompson, M. Lobrich // Mol Cell Biol. – 2003. – V. 23, № 16. – P. 5706-5715.

77. Dobbs, T. A. A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation / T. A. Dobbs, J. A. Tainer, S. P. Lees-Miller // DNA Repair (Amst). – 2010. – V. 9, № 12. – P. 1307-1314.

78. Neal, J. A. Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation / J. A. Neal, V. Dang, P. Douglas, M. S. Wold, S. P. Lees-Miller, K. Meek // Mol Cell Biol. – 2011. – V. 31, № 8. – P. 1719-1733.

79. Schipler, A. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice/ A. Schipler, G. Iliakis // Nucleic Acids Res. – 2013. – V. 41, № 16. – P. 7589-7605.

80. Falk, M. Chromatin dynamics during DSB repair / M. Falk, E. Lukasova, B. Gabrielova, V. Ondrej, S. Kozubek // Biochim Biophys Acta. – 2007. – V. 1773, № 10. – P. 1534-1545.

81. Brandsma, I. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act / I. Brandsma, D. C. Gent // Genome Integr. – 2012. – V. 3, № 1. – P. 9.

82. Singh, P. Dynamics of radiation induced gammaH2AX foci in chromatin subcompartments of mouse pachytene spermatocytes and round spermatids / P. Singh, M. J. Raman // Mol Reprod Dev. – 2014. – V. 81, № 6. – P. 484-496.

83. Kim, J. A. Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals / J. A. Kim, M. Kruhlak, F. Dotiwala, A. Nussenzweig, J. E. Haber // J Cell Biol. – 2007. – V. 178, № 2. – P. 209-218.

84. Cowell, I. G. gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation / I. G. Cowell, N. J. Sunter, P. B. Singh, C. A. Austin, B. W. Durkacz, M. J. Tilby // PLoS One. – 2007. – V. 2, № 10. – P. e1057.

85. Kruhlak, M. J. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks / M. J. Kruhlak, A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W. G. Muller, J. G. McNally, D. P. Bazett-Jones, A. Nussenzweig // J Cell Biol. – 2006. – V. 172, № 6. – P. 823-834.

86. Спивак, И. М. Экология. Повреждение и репарация ДНК: учебное пособие / И. М. Спивак - СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2006. - 171с.

87. Sancar, A. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints / A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn // Annu Rev Biochem. – 2004. – V. 73. – P. 39-85.

88. Goodarzi, A. A. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin / A. A. Goodarzi, A. T. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Lobrich, P. A. Jeggo // Mol Cell. – 2008. – V. 31, № 2. – P. 167-177.

89. Ziv, Y. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway / Y. Ziv, D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D. C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek, Y. Shiloh // Nat Cell Biol. – 2006. – V. 8, № 8. – P. 870-876.

90. Goodarzi, A. A. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response / A. A. Goodarzi, T. Kurka, P. A. Jeggo // Nat Struct Mol Biol. – 2011. – V. 18, № 7. – P. 831-839.

91. Schanz, S. Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation / S. Schanz, N. Schuler, Y. Lorat, L. Fan, L. Kaestner, G. Wennemuth, C. Rube, C. E. Rube // DNA Repair (Amst). – 2012. – V. 11, № 10. – P. 823-832.

92. Belyaev, I. Effects of gamma rays in the 0.5-50-cGy range on the conformation of chromatin in mammalian cells / I. Belyaev, M. Harms-Ringdahl // Radiat Res. – 1996. – V. 145, № 6. – P. 687-693.

93. Beucher, A. ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2 / A. Beucher, J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A. A. Goodarzi, A. Krempler, P. A. Jeggo, M. Lobrich // EMBO J. – 2009. – V. 28, № 21. – P. 3413-3427.

94. Bee, L. The efficiency of homologous recombination and non-homologous end joining systems in repairing double-strand breaks during cell cycle progression / L. Bee, S. Fabris, R. Cherubini, M. Mognato, L. Celotti // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 7. – P. e69061.

95. Minakawa, Y. Gamma-irradiated quiescent cells repair directly induced double-strand breaks but accumulate persistent double-strand breaks during subsequent DNA replication / Y. Minakawa, Y. Atsumi, A. Shinohara, Y. Murakami, K. Yoshioka// Genes Cells. – 2016. – V. 21, № 7. – P. 789-797.

96. Гильяно, Н. Я. Эффективность гено- и цитотоксического действия γ-излучения Иттербия-169 на клетки человека в культуре / Н. Я. Гильяно, Е. В. Журишкина, Л. В. Коневега, С. И. Степанов, С. В. Акулиничев, В. И. Держиев, С. А. Чаушанский, И. А. Яковлев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т. 57, № 5. – С. 452-461.

97. Deckbar, D. Chromosome breakage after G2 checkpoint release / D. Deckbar, J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo, M. Lobrich // J Cell Biol. – 2007. – V. 176, № 6. – P. 749-755.

98. Liang, X. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells / X. Liang, Y. H. So, J. Cui, K. Ma, X. Xu, Y. Zhao, L. Cai, W. Li // J Radiat Res. – 2011. – V. 52, № 3. – P. 380-386.

99. Yamamoto, A. Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells / A. Yamamoto, T. Taki, H. Yagi, T. Habu, K. Yoshida, Y.

Yoshimura, K. Yamamoto, A. Matsushiro, Y. Nishimune, T. Morita // Mol Gen Genet. – 1996. – V. 251, № 1. – P. 1-12.

100. Bishop, D. K. Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo / D. K. Bishop, U. Ear, A. Bhattacharyya, C. Calderone, M. Beckett, R. R. Weichselbaum, A. Shinohara // J Biol Chem. – 1998. – V. 273, № 34. – P. 21482-21488.

101. Bakr, A. Involvement of ATM in homologous recombination after end resection and RAD51 nucleofilament formation / A. Bakr, C. Oing, S. Kocher, K. Borgmann, I. Dornreiter, C. Petersen, E. Dikomey, W. Y. Mansour // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43, № 6. – P. 3154-3166.

102. Vaurijoux, A. Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells / A. Vaurijoux, P. Voisin, A. Freneau, J. F. Barquinero, G. Gruel // Mutat Res. – 2017. – V. 797-799. – P. 15-25.

103. Redon, C. E. gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin / C. E. Redon, J. S. Dickey, W. M. Bonner, O. A. Sedelnikova // Adv Space Res. – 2009. – V. 43, № 8. – P. 1171-1178.

104. Grudzenski, S. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts / S. Grudzenski, A. Raths, S. Conrad, C. E. Rube, M. Lobrich // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – V. 107, № 32. – P. 14205-14210.

105. Ojima, M. Persistence of DNA double-strand breaks in normal human cells induced by radiation-induced bystander effect / M. Ojima, A. Furutani, N. Ban, M. Kai // Radiat Res. – 2011. – V. 175, № 1. – P. 90-96.

106. Alessio, N. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process / N. Alessio, S. Del Gaudio, S. Capasso, G. Di Bernardo, S. Cappabianca, M. Cipollaro, G. Peluso, U. Galderisi // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 10. – P. 8155-8166.

107. Chowdhury, D. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair / D. Chowdhury, M. C. Keogh, H. Ishii, C. L. Peterson, S. Buratowski, J. Lieberman // Mol Cell. – 2005. – V. 20, № 5. – P. 801-809.

108. Chowdhury, D. A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication / D. Chowdhury, X. Xu, X. Zhong, F. Ahmed, J. Zhong, J. Liao, D. M. Dykxhoorn, D. M. Weinstock, G. P. Pfeifer, J. Lieberman // Mol Cell. – 2008. – V. 31, № 1. – P. 33-46.

109. Banath, J. P. Residual gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA lesions / J. P. Banath, D. Klokov, S. H. MacPhail, C. A. Banuelos, P. L. Olive // BMC Cancer. – 2010. – V. 10. – P. 4.

110. Sak, A. Targeting of Rad51-dependent homologous recombination: implications for the radiation sensitivity of human lung cancer cell lines / A. Sak, G. Stueben, M. Groneberg, W. Bocker, M. Stuschke // Br J Cancer. – 2005. – V. 92, № 6. – P. 1089-1097.

111. Belyaev, I. Y. Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry / I. Y. Belyaev // Mutat Res. – 2010. – V. 704, № 1-3. – P. 132-141.

112. Pustovalova, M. Accumulation of spontaneous gammaH2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells / M. Pustovalova, A. Grekhova, T. C. Astrelina, V. Nikitina, E. Dobrovolskaya, Y. Suchkova, I. Kobzeva, D. Usupzhanova, N. Vorobyeva, A. Samoylov, A. Bushmanov, I. V. Ozerov, A. Zhavoronkov, S. Leonov, D. Klokov, A. N. Osipov // Aging (Albany NY). – 2016. – V. 8, № 12. – P. 3498-3506.

113. Максимов, А. А. Основы гистологии. Часть II. / А. А. Максимов - Петроградъ: Издание К.Л. Риккера, 1918. – 624 с.

114. Martin, G. R. Collagen synthesis by cultured human fibroblasts / G. R. Martin, D. L. Layman, A. S. Narayanan, T. P. Nigra, R. C. Siegel // Isr J Med Sci. – 1971. – V. 7, № 3. – P. 455-456.

115. Sorrell, J. M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep / J. M. Sorrell, A. I. Caplan // J Cell Sci. – 2004. – V. 117, № Pt 5. – P. 667-675.

116. Зорин, В. Л. Оптимизация условий получения и ведения культур фибробластов кожи и десны человека / В. Л. Зорин, П. Б. Копнин, А. И. Зорина, И. И. Еремин, Н. Л. Лазарева, Т. С. Чаузова, Д. П. Самчук, А. П. Петрикина, П. С. Еремин, И. Н. Корсаков, О. С. Гринаковская, К. В. Котенко, А. А. Пулин // Гены и Клетки. – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 53-60.

117. Озеров, И. В. Особенности изменения числа фокусов белков γH2AX и Rad51 в фибробластах кожи человека, подвергавшихся пролонгированному воздействию низкоинтенсивного рентгеновского излучения / И. В. Озеров, П. С. Еремин, А. Н. Осипов, И. И. Еремин, А. Д. Цветкова, С. С. Гусева, К. Ю. Иванова, О. И. Гавриленко, М. В. Пустовалова, Н. М. Сметанина, А. К. Грехова, Н. Л. Лазарева, А. А. Пулин, О. А. Максимова, А. В. Гордеев, А. Ю. Бушманов, К. В. Котенко // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 739-743.

118. Озеров, И. В. Математическое моделирование процессов индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках млекопитающих при действии редкоионизирующего излучения с различной мощностью дозы: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. физ.-мат. наук: 03.01.01 / Озеров Иван Витальевич. – М., 2015. – 25 с.

119. Демидович, Б. П. Основы вычислительной математики / Б. П. Демидович, И. А. Марон. – М.: «Наука», 1966. – 664 с.

120. MacPhail, S. H. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays / S. H. MacPhail, J. P. Banath, T. Y. Yu, E. H. Chu, H. Lambur, P. L. Olive // Int J Radiat Biol. – 2003. – V. 79, № 5. – P. 351-358.

121. Osipov, A. N. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells / A. N. Osipov, M. Pustovalova, A. Grekhova, P. Eremin, N. Vorobyova, A. Pulin, A.

Zhavoronkov, S. Roumiantsev, D. Y. Klokov, I. Eremin // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 29. – P. 27275-27287.

122. Osipov, A. N. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation / A. N. Osipov, A. Grekhova, M. Pustovalova, I. V. Ozerov, P. Eremin, N. Vorobyeva, N. Lazareva, A. Pulin, A. Zhavoronkov, S. Roumiantsev, D. Klokov, I. Eremin // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 29. – P. 26876-26885.

123. Gerdes, J. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 / J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, H. Stein // J Immunol. – 1984. – V. 133, № 4. – P. 1710-1715.

124. Zhu, X. Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression / X. Zhu, M. A. Mancini, K. H. Chang, C. Y. Liu, C. F. Chen, B. Shan, D. Jones, T. L. Yang-Feng, W. H. Lee // Mol Cell Biol. – 1995. – V. 15, № 9. – P. 5017-5029.

125. Wei, K. X-ray induced DNA double-strand breakage and rejoining in a radiosensitive human renal carcinoma cell line estimated by CHEF electrophoresis / K. Wei, E. Wandl, K. H. Karcher // Strahlenther Onkol. – 1993. – V. 169, № 12. – P. 740-744.

126. Грехова, А. К. Замедленные процессы образования и деградации фокусов γH2AX в фибробластах кожи человека, облученных рентгеновским излучением в малых дозах / А. К. Грехова, П. С. Еремин, А. Н. Осипов, И. И. Еремин, М. В. Пустовалова, И. В. Озеров, Н. М. Сметанина, Н. Л. Лазарева, Н. Ю. Воробьёва, А. А. Пулин, О. А. Максимова, А. В. Гордеев, А. Ю. Бушманов, К. В. Котенко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 395-401.

127. Riballo, E. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci / E. Riballo, M. Kuhne, N. Rief, A. Doherty, G. C. Smith, M. J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A.

Fricke, A. Krempler, A. R. Parker, S. P. Jackson, A. Gennery, P. A. Jeggo, M. Lobrich // Mol Cell. – 2004. – V. 16, № 5. – P. 715-724.

128. Грехова, А. К. Проблема анализа пострадиационных изменений количества фокусов γH2AX в асинхронной клеточной популяции / А. К. Грехова, М. В. Пустовалова, П. С. Еремин, Е. И. Яшкина, А. Н. Осипов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, № 5. – С. 484-489.

129. Antonelli F. Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death / F. Antonelli, A. Campa, G. Esposito, P. Giardullo, M. Belli, V. Dini, S. Meschini, G. Simone, E. Sorrentino, S. Gerardi, G. A. P. Cirrone, M. A. Tabocchini // Radiation Research. – 2015. – V. 183, № 4. – P. 417-431.

130. Suzuki M. Persistent amplification of DNA damage signal involved in replicative senescence of normal human diploid fibroblasts / M. Suzuki, K. Suzuki, S. Kodama, S. Yamashita, M. Watanabe // Oxid Med Cell Longev. – 2012. – V. 2012. – P. 310534.

131. Baumann, P. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair / P. Baumann, S. C. West // Trends Biochem Sci. – 1998. – V. 23, № 7. – P. 247-251.

132. Грехова, А. К. Оценка вклада гомологической рекомбинации в репарацию двунитевых разрывов ДНК в фибробластах человека после воздействия рентгеновского излучения в малой и средних дозах / А. К. Грехова, М. В. Пустовалова, П. С. Еремин, И. В. Озеров, О. А. Максимова, А. В. Гордеев, Н. Ю. Воробьева, А. Н. Осипов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, № 6. – С. (принята в печать).

133. Tashiro, S. S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes / S. Tashiro, N. Kotomura, A. Shinohara, K. Tanaka, K. Ueda, N. Kamada // Oncogene. – 1996. – V. 12, № 10. – P. 2165-2170.

134. Shibata, A. DNA double-strand break repair in a cellular context / A. Shibata, P. A. Jeggo // Clin Oncol (R Coll Radiol). – 2014. – V. 26, № 5. – P. 243-249.

135. Gelot, C. Replication stress in Mammalian cells and its consequences for mitosis / C. Gelot, I. Magdalou, B. S. Lopez // Genes (Basel). – 2015. – V. 6, № 2. – P. 267-298.

136. Kim, K. P. So similar yet so different: The two ends of a double strand break / K. P. Kim, E. V. Mirkin // Mutat Res. – 2017.10.1016/j.mrfmmm.2017.06.007.

137. Firsanov, D. V. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues / D. V. Firsanov, L. V. Solovjeva, M. P. Svetlova // Clin Epigenetics. – 2011. – V. 2, № 2. – P. 283-297.

138. Suzuki, K. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells / K. Suzuki, S. Kodama, M. Watanabe // Cancer Res. – 2001. – V. 61, № 14. – P. 5396-5401.

139. Kim, C. S. Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts / C. S. Kim, J. M. Kim, S. Y. Nam, K. H. Yang, M. Jeong, H. S. Kim, Y. K. Lim, C. S. Kim, Y. W. Jin, J. Kim // J Radiat Res. – 2007. – V. 48, № 5. – P. 407-415.

140. Fournier, C. Radiation induced cell cycle arrest: an overview of specific effects following high-LET exposure / C. Fournier, G. Taucher-Scholz // Radiother Oncol. – 2004. – V. 73 Suppl 2. – P. 119-122.

141. Tenhumberg, S. Cell cycle arrest and aberration yield in normal human fibroblasts. II: Effects of 11 MeV u-1 C ions and 9.9 MeV u-1 Ni ions / S. Tenhumberg, E. Gudowska-Nowak, E. Nasonova, S. Ritter // Int J Radiat Biol. – 2007. – V. 83, № 8. – P. 501-513.

142. Qvarnstrom, O. F. DNA double strand break quantification in skin biopsies / O. F. Qvarnstrom, M. Simonsson, K. A. Johansson, J. Nyman, I. Turesson // Radiother Oncol. – 2004. – V. 72, № 3. – P. 311-317.

143. Wang, L. H. Monitoring drug-induced gammaH2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells / L. H. Wang, T. D. Pfister, R. E. Parchment, S. Kummar, L. Rubinstein, Y. A. Evrard, M. E. Gutierrez, A. J. Murgo, J. E. Tomaszewski, J. H. Doroshow, R. J. Kinders // Clin Cancer Res. – 2010. – V. 16, № 3. – P. 1073-1084.

144. Островская, Л. А. Клеточные эффекты противоопухолевого препарата аурумакрила / Л. А. Островская, А. К. Грехова, Д. Б. Корман, А. Н. Осипов, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, К.А. Абзаева// БИОФИЗИКА. – 2017. – Т. 62, № 3. – С. 598-603.

145. Vorobyeva, N. Y. Interleukin-1beta Can Reduce Manifestations of Delayed Effects of Prolonged Exposure to Low-Intensity gamma-Radiation / N. Y. Vorobyeva, A. K. Grekhova, K. Y. Trubitsina, A. V. Pchelka, L. M. Rozhdestevenskiy, A. N. Osipov // Bull Exp Biol Med. – 2016. – V. 160, № 4. – P. 470-473.

146. Mondal, N. K. Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India / N. K. Mondal, B. Mukherjee, D. Das, M. R. Ray // Mutat Res. – 2010. – V. 697, № 1-2. – P. 47-54.

147. UNSCEAR. 2012. Report to the General Assembly with Scientific Annexes. // UNITED NATIONS. New York. – 2015.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

№	Автор	Название статьи	Год	Тип клеток	Доза	Время инкубации
1.	Rothkamm K. и Lobrich M.	Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses	2003	неделящиеся фибробласты	1,2 мГр 5 мГр 20мГр 200 мГр 2000 мГр	3 мин 15 мин 2 ч 24 ч
2.	Lobrich M. et al.	In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations	2005	фибробласты	20 мГр	5 мин 30 мин 1 ч 2,5 ч 5 ч 24 ч
				лимфоциты от доноров	5 мГр 20 мГр 100 мГр 500 мГр 1000 мГр	5 мин 30 мин 1 ч 2,5 ч 5 ч
3.	Costes S.V. et al.	Imaging features that discriminate between foci induced by high- and low-LET radiation in human fibroblasts	2006	иммортализо-ванные фибробласты линии HCA2	100 мГр 300 мГр 600 мГр 1000 мГр 3000 мГр	5 мин 15 мин 30 мин 45 мин 1 ч 2 ч
4.	Markova E. et al.	Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival	2007	фибробласты линии VH-10	10 мГр 50 мГр 100 мГр 500 мГр 1000 мГр	30 мин
5.	Asaithamby A. и Chen D. J.	Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose c-irradiation	2009	фибросаркома	5 мГр 10 мГр 50 мГр 250 мГр 500 мГр 750 мГр 1000 мГр	30 мин 1 ч 2 ч 4 ч 8 ч
6.	Grudzenski S. et al.	Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human	2010	фибробласты человека линии HSF1	2,5 мГр 10 мГр 20 мГр 40 мГр	15 мин 2.5 ч 5 ч 24 ч

		fibroblasts.			80 мГр 200 мГр	48 ч 72 ч
7.	Lobrich M. et al.	γH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization	2010	фибробласты человека дикого типа (MRC-5)	3000 мГр	3 мин 15 мин 2 ч 4 ч 8 ч 24 ч
8.	Wilson P. et al.	Inter-individual variation in DNA double-strand break repair in human fibroblasts before and after exposure to low doses of ionizing radiation	2010	25 клет. линий фибробластов в фазе G0/G1	50 мГр 100 мГр 250 мГр	10 мин 30 мин 2 ч 24 ч
9.	Martin O. et al.	Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNArepair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity	2013	первичные фибробласты кожи	3000 мГр	15 мин 2 ч 6 ч 8 ч 24 ч 48 ч 72 ч
10.	Minakawa Y. et al.	Gamma-irradiated quiescent cells repair directly induced double-strand breaks but accumulate persistent double-strand breaks during subsequent DNA replication	2016	эмбриональ-ные фибробласты мыши дикого типа пролифериру ющие и покоящиеся	2000 мГр	5мин 15 мин 1 ч 3 ч 6ч 24 ч 48 ч 72ч

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает особую благодарность руководителю диссертации доктору биологических наук, профессору Осипову А.Н. за идею, лежащую в основе данной работы, ценные советы и предложения. Особую признательность хочу выразить сотрудникам Лаборатории радиационной биофизики и Лаборатории радиационной стерилизации и экспериментальных облучений Федерального медицинского биофизического центра им. А.И. Бурназяна ФМБА России, в особенности, Пустоваловой М.В., Озерову И.В. и Максимовой О.А. за помощь в реализации экспериментов, а также Еремину П.С. за предоставление клеточных культур. Слова искренней благодарности хочу сказать заведующему Лаборатории количественной онкологии Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН д.м.н., профессору Корману Д.Б. и д.б.н., профессору Горбачевой Л.Б. за полезные советы и замечания в ходе работы над текстом диссертации, а также за всестороннюю поддержку на протяжении всего исследовательского процесса.