

УДК [57+61]:539.1.047:614.856:612.112.94

ДВУНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ИМПУЛЬСНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ: НЕЛИНЕЙНАЯ ДОЗОВАЯ ЗАВИСИМОСТЬ

© 2012 г. С. А. Васильев^{1,*}, Е. Ю. Степанова², О. П. Кутенков³, А. А. Беленко², Л. П. Жаркова^{2,3}, М. А. Большаков^{2,3}, И. Н. Лебедев¹, В. В. Ростов³

¹НИИ медицинской генетики СО РАМН, Томск

²Томский государственный университет, Томск

³Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск

Цель исследования — изучение и анализ влияния дозы и частоты импульсов импульсно-периодического рентгеновского излучения на количество двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека и динамику их репарации *in vitro*. Для оценки количества повреждений в клетках и их восстановления был использован анализ флуоресцентных фокусов белков γ H2AX и 53BP1. Дозовая зависимость количества радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК характеризовалась отклонениями от линейности в сторону повышения эффекта в диапазоне 12–32 мГр и снижением эффекта относительно ожидаемого при дальнейшем увеличении дозовой нагрузки до 72 мГр. Дозовая зависимость при воздействии в дозах больше 100 мГр была линейной. Кроме того, количество фокусов γ H2AX и 53BP1 зависело от частоты импульсов импульсно-периодического рентгеновского излучения — максимальный генотоксический эффект был зарегистрирован при воздействии с частотой 13 имп./с. При этом наблюдалась замедленная динамика исчезновения радиационно-индуцированных фокусов, образованных после воздействия импульсно-периодического рентгеновского излучения в дозах, вызывающих отклонение от линейной дозовой зависимости.

Импульсно-периодическое рентгеновское излучение, малые дозы, радиочувствительность, радиационно-индуцированные фокусы, γ H2AX, 53BP1, нелинейная зависимость от дозы.

Относительно недавно для медико-биологических исследований были разработаны источники рентгеновского излучения, способные генерировать импульсно-периодическое рентгеновское излучение (ИПРИ) в режиме с частотами повторения импульсов от единиц до сотен в секунду, длительностью импульсов в несколько наносекунд и в дозах от 10 мкГр до нескольких мГр за импульс [1]. В ранее проведенных исследованиях было обнаружено, что воздействие ИПРИ в малых дозах с частотами повторения импульсов в диапазоне 8–22 имп./с эффективно ингибирует пролиферацию клеток мастоцитомы P-815, карциномы Эрлиха и клеток HeLa [2]. Для этих результатов, описывающих цитотоксический эффект ИПРИ, общим и характерным было то, что величина эффекта зависела от частоты повторения импульсов и дозы излучения.

Двунитевые разрывы ДНК являются наиболее значимыми для клетки повреждениями хромосомного материала при воздействии ионизирующего излучения [3]. Несмотря на успешное восстановление большинства из них, цепи ДНК, не репарированные или неправильно репарированные от разрывов, могут приводить к образованию хромосомных aberrаций и гибели клеток [4]. В клетке в ходе ответа на действие ионизирующего излучения наблюдается образование так называемых радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК [5]. Они являются динамическими структурами, содержащими тысячи копий белков гистона H2A, участвующих в различных этапах репарации ДНК от двунитевых разрывов и передаче сигналов. Эти структуры могут оцениваться микроскопически в виде дискретных фокусов γ H2AX [6]. Так как количество радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX точно отражает количество двунитевых разрывов, принято считать, что фокусы γ H2AX локализуются в местах двунитевых разрывов ДНК [7, 8]. Среди белков, участвующих в образовании радиационно-индуцированных фокусов, особое значение при-

* Адресат для корреспонденции: 634050 Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10, НИИ медицинской генетики СО РАМН; тел.: (3822) 51-31-46; факс: (3822) 51-37-44; e-mail: stas.vasilyev@gmail.com.

Использованные в эксперименте суммарные поглощенные дозы и время воздействия на лимфоциты периферической крови человека ИПРИ в условиях *in vitro*

Частота, имп./с	Доза за импульс, мГр					Время воздействия, мин
	0.003	0.008	0.018	0.040	0.080	
8	1.44	3.84	8.64	19.20	38.40	8.33
13	2.34	6.24	14.04	31.20	62.40	5.13
25	4.50	12.00	27.00	60.00	120.00	2.67

дается фосфорилированному гистону H2AX и медиаторному белку 53BP1, играющим важную роль в репарации ДНК от двуниевых разрывов [7, 9, 10]. Сообщалось, что колокализированные в одном участке клеточного ядра флуоресцентные фокусы белков γ H2AX и 53BP1 более точно отражают динамику репарации ДНК от двуниевых разрывов в клетках, чем отдельно фокусы белка γ H2AX [11].

Учитывая важность и необходимость изучения генотоксических эффектов воздействия ИПРИ в малых дозах целью настоящего исследования было установление влияния дозы и частоты повторения импульсов ИПРИ на количество радиационно-индуцированных двуниевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека и динамику репарации ДНК от них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Выделение лимфоцитов периферической крови. В качестве материала в исследовании использовали лимфоциты периферической крови двух здоровых индивидов (1 мужчина, 1 женщина). Забор крови из локтевой вены производили в вакуумные пробирки типа Vacutainer (“BD Bioscience”), покрытые изнутри натриевой солью гепарина в качестве антикоагулянта. Лимфоциты из периферической крови выделяли с помощью центрифугирования в градиенте ($\rho = 1.077$) Фикол-верографина (“ПанЭко”). После выделения клетки суспендировали до концентрации 3×10^6 клеток/мл в среде RPMI 1640 с добавлением 10%-ной сыворотки крови плодов крупного рогатого скота – fetal blood serum (FBS) (“Sigma”). Полученную клеточную суспензию разделяли на порции по 3 мл в пластиковые центрифужные пробирки (Greiner) и транспортировали во льду для проведения воздействия ИПРИ.

Воздействие импульсно-периодическим рентгеновским излучением. В качестве источника импульсно-периодического рентгеновского излучения использовалось тормозное излучение электронов сильнооточного электронного пучка на аноде ускорителя “Sinus 150” (ускоряющее напряжение 260 кВ, сила тока 4 кА, максимальная энергия 90–100 кэВ, длительность импульса 4 нс).

Во время облучения пробирки с культурой клеток размещали на определенном расстоянии от анода ускорителя, что обеспечивало требуемую дозу. Измерения доз производили на различных расстояниях от коллектора (3–70 см) вдоль оси системы с использованием термолюминесцентного дозиметра “КДТ-02М” (Россия) и электростатического дозиметра с кварцевым волокном серии “Arrow-Tech” модель “138-S” (США) [1]. Лимфоциты периферической крови подвергали воздействию 4000 импульсов ИПРИ с частотами повторения импульсов 8, 13 и 25 имп./с в дозах 0.003; 0.008; 0.018; 0.04 и 0.08 мГр/имп. (таблица).

Иммуноокрашивание. После облучения клетки транспортировали во льду и инкубировали в термостате при 37°C для оценки динамики репарации ДНК через 30 мин, 2 ч и 18 ч. Фиксацию клеток проводили в соответствии со следующим протоколом. Через 30 мин, 2 ч и 18 ч после воздействия ИПРИ отбирали часть клеточной суспензии, центрифугировали 5 мин при 200 g при +4°C, удаляли надосадочную жидкость и к клеточному осадку прибавляли раствор фосфатного буфера (PBS). После повторного центрифугирования в тех же условиях в пробирках оставляли 50 мкл клеточной суспензии, которую наносили на предметные стекла, покрытые полилизинном для улучшения адгезии (Menzel). Препараты накрывали покровным стеклом и оставляли на 10 мин, после чего покровное стекло удаляли и препараты фиксировали в 3%-ном растворе пара-формальдегида в течение 20 мин при +4°C. После дальнейшей отмывки в PBS проводили пермеабиллизацию клеток в 0.2%-ном растворе Triton X-100 (“Sigma”) в течение 10 мин при +4°C. Затем препараты отмывали по 5 мин в трех сменах PBS и помещали в 3%-ный раствор FBS на 30 мин при +4°C.

Для иммуноокрашивания были использованы следующие первичные антитела: моноклональные мышинные антитела к белку γ H2AX (“Novus”) и поликлональные антитела кролика к белку 53BP1 (“Novus”). Вторичными антителами, несущими флуорохромы, были мышинные антитела к иммуноглобулинам кролика (“Novus”), конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), и кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши (“Novus”), конъюгированные с рода-

мином. На препараты наносили по 50 мкл раствора первичных антител в 3%-ном FBS в концентрации 1 : 1000, оставляли инкубироваться в течение 1 ч при комнатной температуре. После отмывки в трех сменах PBS по 5 мин повторяли инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре с раствором вторичных антител в 3%-ном FBS (1 : 1000). Затем препараты, отмывые в трех сменах PBS по 5 мин, окрашивали раствором DAPI ("Sigma") в конечной концентрации 0.3 мкмоль/л, после чего наносили антиокислительный агент для микроскопирования, который предотвращает быстрое выцветание флуоресцентного сигнала под действием ультрафиолетового излучения – 10%-ный глицерин и 0.2%-ный диазобицикло-2,2,2-октан (DABCO) ("Sigma"). Поле, в котором проходило иммунное окрашивание, накрывали покровным стеклом. Препараты хранили до микроскопирования в темноте при +4°C.

Получение изображений и оценка фокусов белков репарации ДНК. Визуализация флуоресцентных сигналов осуществлялась на микроскопе Axio Imager M1 ("Zeiss") при увеличении в 1200 раз. Съемку производили с помощью трех фильтров (синий – DAPI, красный – родамин, зеленый – FITC). Съемка с помощью синего фильтра производилась в одной фокальной плоскости для получения контуров ядер клеток. С красным и зеленым фильтрами получали изображения с семи фокальных плоскостей с шагом в 1 мкм между плоскостями с дальнейшим слитием в одно результирующее изображение. Учитывая, что средняя толщина ядер лимфоцитов составляет около 7 мкм, эта процедура позволила получить информацию о наличии флуоресцентных фокусов по всей толщине ядер клеток. На каждом препарате производилась оценка количества фокусов белков γ H2AX, 53BP1 и колокализованных фокусов обоих белков в 100–150 клетках. Подсчет фокусов на полученных изображениях производили вручную. Эксперимент был проведен в трех повторностях.

Статистическая обработка. Для оценки нормальности распределения количества фокусов в клетках применяли критерий Колмогорова–Смирнова. Статистический анализ зависимости количества фокусов от времени после облучения и частоты повторения импульсов проводили с использованием дисперсионного анализа. В дальнейшем для множественных сравнений количества фокусов использовали критерий Шеффе. Для проведения апостериорных сравнений с контрольным уровнем фокусов использовали критерий Даннета. Зависимость количества фокусов от дозы ИПРИ оценивали с помощью регрессионного анализа. Все статистические процедуры были проведены с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (Statsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость количества фокусов от дозы ИПРИ. В отсутствие воздействия ИПРИ фоновый уровень количества фокусов был одинаков во всех вариантах проведения эксперимента на разных временных точках (0.4–0.6 фокусов на клетку). При этом доля фокусов γ H2AX, колокализованных с фокусами 53BP1, составляла $69.0 \pm 3.51\%$. Это указывает на отсутствие заметной динамики спонтанных фокусов в условиях инкубирования лимфоцитов в среде при проведении эксперимента.

Через 30 мин после воздействия ИПРИ количество фокусов γ H2AX, 53BP1 и колокализованных фокусов повышалось относительно контрольных значений (рис. 1). Статистически значимым увеличением количества фокусов становилось при воздействии ИПРИ в дозах более 32 мГр при 13 имп./с ($p < 0.01$). При воздействии ИПРИ с частотой повторения импульсов 8 и 25 имп./с значимые отличия от контрольного уровня наблюдались только при облучении в дозах более 160 мГр ($p < 0.05$). Зависимость количества фокусов от дозы ИПРИ имела сложный нелинейный характер (рис. 1), что в основном было обусловлено отклонениями от линейной дозовой зависимости в области очень малых доз (10–30 мГр). Так, зависимость количества фокусов от дозы ИПРИ с частотами повторения 8 и 25 имп./с имела характерное плато в диапазоне 12–72 мГр. В то же самое время в диапазоне доз от 160 до 320 мГр зависимость количества фокусов γ H2AX от дозы ИПРИ становилась линейной (0.0082 и 0.0097 фокуса/мГр при использовании частот повторения 8 и 25 имп./с соответственно). Количество фокусов 53BP1 и колокализованных фокусов обоих белков также линейно зависело от дозы ИПРИ в данном диапазоне: коэффициенты линейной регрессии составляли 0.0064 и 0.0072 фокуса/мГр для частот повторения импульсов 8 и 25 имп./с соответственно.

Через 30 мин после воздействия ИПРИ с частотой повторения импульсов 13 имп./с в дозе 32 мГр наблюдался гиперчувствительный ответ клеток, выражающийся в повышении наблюдаемого количества фокусов белков γ H2AX и 53BP1 относительно теоретически ожидаемых значений при экстраполяции данных из области более высоких доз (более 100 мГр) (рис. 1). При этом количество фокусов γ H2AX, 53BP1 и колокализованных фокусов обоих белков после воздействия ИПРИ частотой повторения импульсов 13 имп./с в дозе 32 мГр было значимо выше ($p < 0.05$) по сравнению с другими частотами импульсов. В диапазоне 0–32 мГр увеличение количества фокусов γ H2AX с возрастанием дозы ИПРИ с частотой 13 имп./с было линейным и составляло 0.0434 фокуса/мГр. Сопоставимые коэффициенты отмеча-

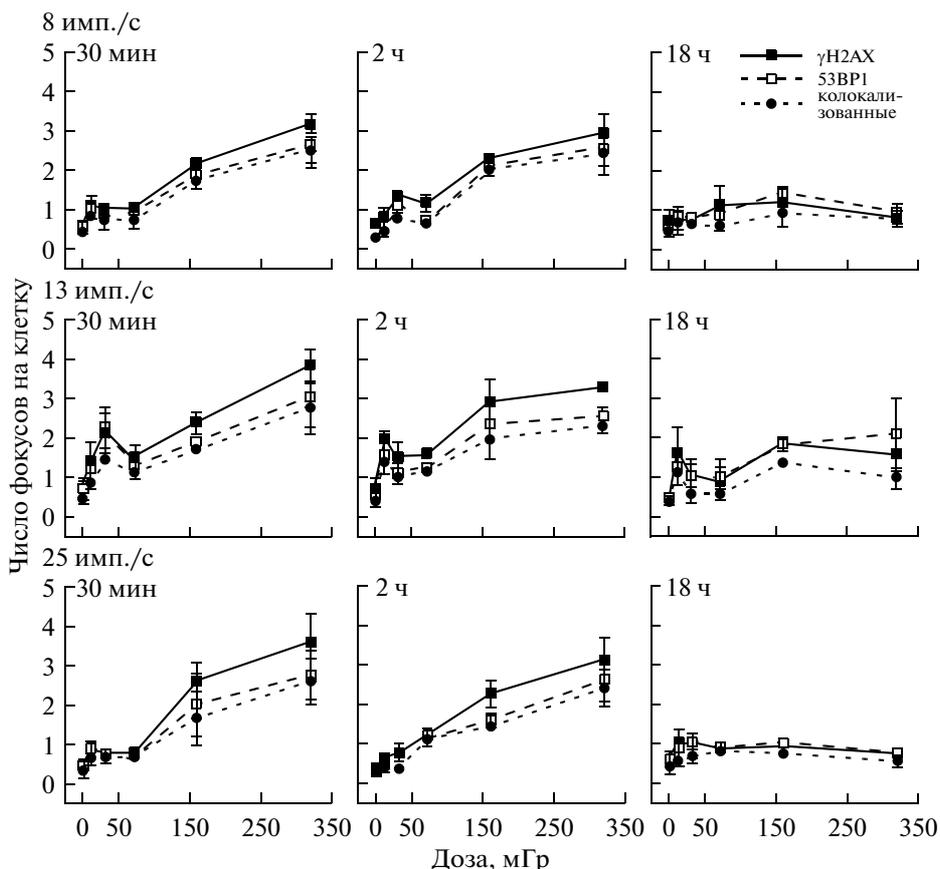


Рис. 1. Зависимость количества фокусов γ H2AX, 53BP1 и колокализованных фокусов обоих белков в лимфоцитах периферической крови человека от дозы ИПРИ и времени репарации двунитевых разрывов ДНК при инкубировании клеток после воздействия *in vitro*. На графиках представлены средние значения \pm стандартные ошибки среднего.

лись как для возрастания количества фокусов 53BP1, так и для колокализованных фокусов обоих белков при этих условиях воздействия (0.0487 и 0.0309 фокуса/мГр соответственно). При дальнейшем увеличении дозы ИПРИ наблюдалось нарушение линейной зависимости в сторону уменьшения радиационно-индуцированного эффекта с минимумом в области 72 мГр. В диапазоне доз от 160 до 320 мГр через 30 мин после воздействия график зависимости количества фокусов γ H2AX от дозы ИПРИ снова становился линейным (0.0098, 0.0073 и 0.0072 фокуса/мГр). Таким образом, возрастание числа фокусов на единицу поглощенной дозы ИПРИ в диапазоне доз 0–32 мГр в 4–6 раз больше, чем соответствующие значения при больших дозах воздействия (160–320 мГр).

Динамика численности фокусов после воздействия ИПРИ. После воздействия ИПРИ со всеми использованными частотами импульсов (8, 13 и 25 имп./с) на временном отрезке между 30 мин и 2 ч после облучения количество фокусов значимо не изменялось после воздействия ИПРИ в дозе больше 32 мГр (рис. 1).

При проведении анализа динамики числа фокусов во времени от 30 мин до 18 ч после облучения с помощью критерия Шеффе было обнаружено, что значимое уменьшение количества фокусов отмечается лишь для γ H2AX, 53BP1 и колокализованных фокусов после воздействия ИПРИ в дозе больше 160 мГр ($p < 0.05$) (рис. 2). Количество фокусов после воздействия ИПРИ в меньших дозах во времени значимо не изменялось. Остаточное количество фокусов значимо отличалось от контрольного уровня при воздействии ИПРИ с частотой 13 имп./с в дозах 12, 160 и 320 мГр (критерий Даннета, $p < 0.05$). Таким образом, ИПРИ с частотой импульсов 13 имп./с вызывало образование одинакового количества остаточных радиационно-индуцированных фокусов (~1 фокус γ H2AX на клетку) при воздействии как в очень малых дозах (12 мГр), так и в дозах, больших на порядок (160, 320 мГр).

Обращает на себя внимание временная динамика степени колокализации фокусов γ H2AX и 53BP1. Доля фокусов γ H2AX, колокализованных с фокусами 53BP1, составляла в среднем при всех дозовых нагрузках $74.0 \pm 2.5\%$ через 30 мин, зна-

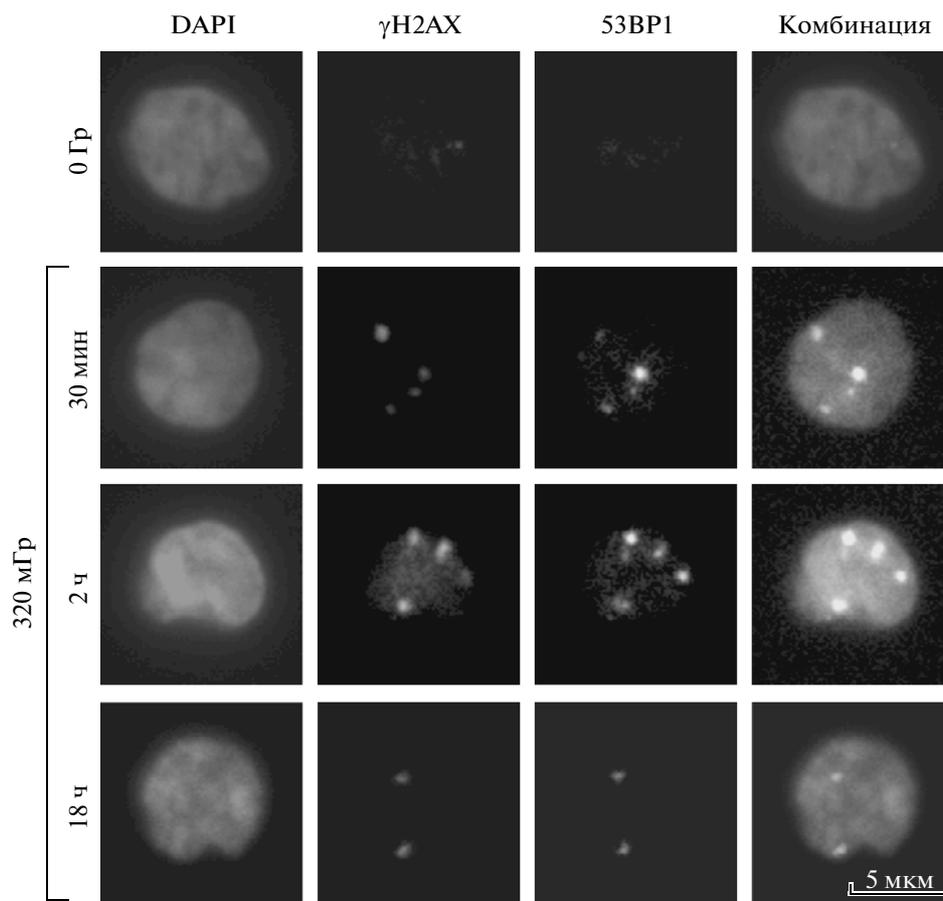


Рис. 2. Фокусы γ H2AX и 53BP1 в лимфоцитах периферической крови человека через 30 мин, 2 ч и 18 ч после воздействия ИПРИ в дозе 320 мГр. Представленные ядра клеток окрашены ДНК-красителем DAPI (синий цвет), фокусы γ H2AX имеют красный цвет, фокусы 53BP1 – зеленый цвет.

чимо снижаясь до $67.3 \pm 2.3\%$ через 2 ч и снова возрастая до $77.9 \pm 2.7\%$ через 18 ч после воздействия ИПРИ ($p < 0.05$). Возможно, сниженная степень колокализации фокусов белков γ H2AX и 53BP1 через 2 ч после воздействия ИПРИ обусловлена большей скоростью возникновения в местах двунитевых разрывов фокусов γ H2AX по сравнению с фокусами 53BP1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Дозовая зависимость. После воздействия в условиях как *in vitro* [12, 13], так и *in vivo* [14, 15] в клеточных системах обычно наблюдается линейная зависимость количества радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX и 53BP1 от дозы ионизирующего излучения с различными характеристиками. Однако в настоящей работе была обнаружена нелинейная зависимость количества радиационно-индуцированных фокусов от дозы импульсно-периодического рентгеновского излучения. В литературе такое отклонение от линейной дозовой зависимости хорошо известно

прежде всего из результатов исследований, проведенных для оценки клональной выживаемости, и получило название гиперрадиочувствительности в диапазоне малых доз [16, 17]. В настоящем исследовании нелинейность дозовой зависимости была вызвана гиперрадиочувствительностью в диапазоне доз от 10 до 30 мГр, после которой при дальнейшем увеличении дозы следовала повышенная радиорезистентность с минимальной реакцией на воздействие ИПРИ в дозе 72 мГр. Подобный эффект отмечался и в других исследованиях влияния ионизирующего излучения в малых дозах [6, 17]. Так, нелинейная зависимость количества фокусов γ H2AX и 53BP1 в фибробластах человека от дозы ионизирующего излучения зарегистрирована при облучении в дозах от 10 до 50 мГр [11]. Сходная гиперчувствительность к воздействию радиации в дозах менее 50 мГр была обнаружена в клетках V79-4 по показателю числа фокусов γ H2AX [18]. Кроме того, повышенная радиочувствительность в области малых доз была обнаружена в лимфоцитах периферической крови после воздействия рентгеновскими

лучами [19]. Также наблюдали гиперчувствительность при облучении в малых дозах по показателю фокусов белка АТМ в фибробластах после воздействия рентгеновскими лучами. Количество фокусов белка АТМ гораздо сильнее увеличивалось с повышением дозы в диапазоне 1.2–5.0 мГр по сравнению с диапазоном 10–200 мГр [20]. Подобный эффект наблюдался также после воздействия α -частиц в малых дозах [21].

Выраженность гиперчувствительного ответа клеток в наших опытах была различной для ИПРИ с различными частотами импульсов (8, 13 и 25 имп./с). При этом количество радиационно-индуцированных фокусов было наибольшим после воздействия ИПРИ с частотой импульсов 13 имп./с ($p < 0.05$). Данный факт может объясняться влиянием частоты импульсов ИПРИ на формирование общего радиационно-индуцированного эффекта. Помимо этого, зависимость количества фокусов от частоты повторения импульсов ИПРИ может быть обусловлена различными мощностями дозы, формируемыми за счет изменения частоты повторения импульсов при неизменном количестве импульсов ИПРИ. В этом отношении интересны исследования, показывающие обратную зависимость эффектов от мощности дозы при воздействии ионизирующего излучения в диапазоне малых доз [22].

Большинство работ по изучению гиперрадиочувствительности клеток в диапазоне малых доз проведено с использованием метода оценки клональной выживаемости, позволяющего фиксировать лишь конечный результат воздействия, выражающийся в гибели определенного процента клеток [17]. В результате этих исследований было сформулировано несколько гипотез, направленных на объяснение причин нелинейного характера дозовой зависимости повреждений в клетках при воздействии ионизирующего излучения в малых дозах. Одной из таких причин может быть повышенная радиочувствительность отдельных субпопуляций клеток [17]. Однако в настоящей работе распределение клеток с различным количеством фокусов после воздействия ИПРИ не отклонялось от нормального, что указывает на равномерную реакцию всех клеток на воздействие.

Помимо этого, была предложена гипотеза, основанная на большей радиочувствительности клеток в фазе G_2 клеточного цикла и объясняющая феномен повышенной радиорезистентности в диапазоне малых доз активацией сверхочной точки клеточного цикла в фазе G_2 [23, 24]. Однако использование в нашем исследовании лимфоцитов периферической крови, покоящихся в фазе G_0 , не позволяет объяснить гиперрадиочувствительность в диапазоне малых доз дифференциальной реакцией клеток в различных фазах клеточного цикла.

Возникновение радиационно-индуцированных флуоресцентных фокусов белков репарации ДНК после воздействия ИПРИ во всех дозах указывает на включение систем репарации от двунитевых разрывов (фокусы белка γ H2AX) и систем активации сверхочных точек (фокусы белка 53BP1) в ответ на воздействие ИПРИ. Поэтому обнаруженная в настоящем исследовании повышенная радиочувствительность лимфоцитов периферической крови человека к воздействию ИПРИ с частотой повторения импульсов 13 имп./с в диапазоне доз от 10 до 30 мГр не может быть также объяснена несрабатыванием систем репарации ДНК в диапазоне сверхмалых доз. Таким образом, вероятно, в основе обнаруженных в настоящей работе эффектов лежит повышенная способность ИПРИ в малых дозах индуцировать двунитевые разрывы ДНК за счет резкого повышения уровня окислительного стресса. К такому же выводу пришла и группа коллег из Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна), которые с помощью анализа анафазного отставания хромосом и микроядерного теста обнаружили феномен гиперрадиочувствительности в клетках линии V79 [25], клетках меланомы [26] и лимфоцитах периферической крови человека [27].

Динамика фокусов после воздействия ИПРИ. В проведенных экспериментах количество фокусов γ H2AX и 53BP1 через 18 ч после воздействия ИПРИ либо возвращалось к исходному (спонтанному) уровню, либо в клетках наблюдалось остаточное количество радиационно-индуцированных фокусов. Наибольшее количество радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX и 53BP1 наблюдалось через 18 ч после воздействия ИПРИ с частотой повторения импульсов 13 имп./с, что отмечалось и через 30 мин после начала репарации. После воздействия ИПРИ с другими частотными параметрами отмечалось наличие примерно 0.5 остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 на клетку через 18 ч репарации.

После воздействия ИПРИ с частотой импульсов 13 имп./с количество остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 было одинаково высоким через 18 ч после воздействия в дозах 12, 160 и 320 мГр. При этом уровень остаточных фокусов после воздействия ИПРИ в дозе 12 мГр оставался постоянным от 2 до 18 ч после начала репарации, в то время как количество фокусов, индуцированных ИПРИ в дозах 160 и 320 мГр за этот период уменьшилось в 1.5 раза. Таким образом, фокусы, индуцированные ИПРИ в дозах, для которых регистрировался гиперрадиочувствительный ответ через 30 мин после воздействия, видимо образуются в участках ДНК вокруг труднорепазируемых двунитевых разрывов. Более того, после воздействия ИПРИ в больших дозах с аналогичной частотой 13 имп./с количество таких двунитевых разрывов ДНК с затрудненной репарацией оста-

ется постоянным. Ранее, в экспериментах на цельной крови было показано, что количество фокусов γ H2AX, индуцированных рентгеновским воздействием, не снижалось до спонтанного уровня в течение 24 ч после облучения в дозах 5 и 200 мГр, достигая лишь 40% от начального уровня [19]. Соответствующий количественный уровень после воздействия на выделенные лимфоциты в дозе 200 мГр составлял 10%. Как полагают авторы, воздействие рентгеновского излучения в малых дозах индуцировало два типа двунитевых разрывов ДНК. Первый тип представлял собой двунитевые разрывы с пониженной способностью к репарации, зависящие от условий облучения и возможно связанные с эффектом свидетеля. Вторая часть фокусов видимо содержала двунитевые разрывы ДНК с меньшим полупериодом репарации, равным 3–4 ч. Затрудненная репарация ДНК от радиационно-индуцированных разрывов может определяться, с одной стороны, высокой степенью окисления концов разрыва, а с другой – формированием кластерных повреждений, затрудняющих репарацию ДНК от двунитевых разрывов [3, 28].

Недавно было обнаружено, что запуск и протекание репарации ДНК от двунитевых разрывов после воздействия радиации зависит от количественного уровня либо окислительного стресса, либо одностранных разрывов ДНК [29]. Репарация ДНК от двунитевых разрывов (оцененная как возникновение и исчезновение радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX) была затруднена при воздействии радиации в дозах менее 10 мГр. Интересно, что при обработке клеток 10 мкмоль/л H_2O_2 перед воздействием радиации в клетках наблюдалась полная репарация ДНК от всех радиационно-индуцированных двунитевых разрывов. Авторы делают вывод о том, что окислительного стресса после воздействия радиации в малых дозах недостаточно для запуска сигнальных путей, приводящих к репарации ДНК от двунитевых разрывов [29]. Обработка клеток H_2O_2 вызывает значительное повышение окислительного стресса и количества одностранных разрывов ДНК, что, видимо, приводит, в том числе, и к запуску процессов репарации ДНК от двунитевых разрывов. Эта гипотеза хорошо объясняет результаты настоящего исследования в части повышенного количества разрывов ДНК при воздействии ИПРИ в диапазоне сверхмалых доз (10–30 мГр), который, видимо, обусловлен нарастающим прямым и непрямым действием радиации в отсутствие нормальной репарации ДНК. При этом пониженный уровень числа повреждений в диапазоне 50–70 мГр вероятно связан с включением механизмов, направленных на понижение окислительного стресса и репарацию двунитевых разрывов ДНК.

Таким образом, в настоящем исследовании обнаружены отклонения от линейной дозовой зави-

симости количества двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови человека при воздействии ИПРИ в условиях *in vitro*. Данные о наличии подобной дозовой зависимости при воздействии различных типов ионизирующего излучения [21, 25–27] позволяют говорить о том, что данный эффект не является специфическим для импульсно-периодического характера воздействия. С другой стороны, при воздействии ИПРИ с частотами импульсов 8 и 25 имп./с не отмечалось отклонений от линейной дозовой зависимости частоты возникновения двунитевых разрывов ДНК. Поэтому обнаруженное влияние частоты импульсов ИПРИ на количество фокусов γ H2AX и 53BP1 и динамику их репарации указывает на необходимость дальнейшего изучения наблюдаемых изменений с целью понимания причин и механизмов реализации влияния различных параметров данного вида излучения на радиационно-индуцированный клеточный ответ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке государственных контрактов ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.” № П1080, ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 гг.” № 16.512.11.2063, АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы” № 2.1.1/13778.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемов К.П., Ельчанинов А.А., Кутенков О.П. и др. // Приборы и техника эксперимента. 2004. № 5. С. 166–167.
2. Литвяков Н.В., Постов В.В., Булдаков М.А. и др. // Сиб. онкол. журн. 2006. Т. 1. С. 24–31.
3. Asaithamby A., Hu B., Chen D.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 20. P. 8293–8298.
4. Natarajan A.T., Palitti F. // Mutat. Res. 2008. V. 657. № 1. P. 3–7.
5. Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R. et al. // J. Cell. Biol. 2006. V. 173. № 2. P. 195–206.
6. Belyaev I.Y. // Mutat. Res. 2010. V. 704. № 1–3. P. 132–141.
7. Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G. et al. // Radiat. Res. 2002. V. 158. № 4. P. 486–492.
8. Rothkamm K., Lobrich M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 9. P. 5057–5062.
9. Schultz L.B., Chehab N.H., Malikzay A. et al. // J. Cell. Biol. 2000. V. 151. № 7. P. 1381–1390.
10. Rappold I., Iwabuchi K., Date T. et al. // J. Cell. Biol. 2001. V. 153. № 3. P. 613–620.
11. Markova E., Schultz N., Belyaev I.Y. // Int. J. Radiat. Biol. 2007. V. 83. № 5. P. 319–329.
12. Hamada N., Schettino G., Kashino G. et al. // Radiat. Res. 2006. V. 166. № 1. Pt 1. P. 31–38.
13. Olive P.L., Banath J.P., Keyes M. // Radiother. Oncol. 2008. V. 86. № 3. P. 336–346.

14. Rube C.E., Grudzinski S., Kuhne M. et al. // Clin. Cancer Res. 2008. V. 14. № 20. P. 6546–6555.
15. Sak A., Grehl S., Erichsen P. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 2007. V. 83. № 10. P. 639–652.
16. Joiner M.C., Marples B., Lambin P. et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2001. V. 49. № 2. P. 379–389.
17. Marples B., Collis S.J. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2008. V. 70. № 5. P. 1310–1318.
18. Leatherbarrow E.L., Harper J.V., Cucinotta F.A. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 2006. V. 82. № 2. P. 111–118.
19. Beels L., Werbrouck J., Thierens H. // Int. J. Radiat. Biol. 2010. V. 86. № 9. P. 760–768.
20. Ojima M., Ban N., Kai M. // Radiat. Res. 2008. V. 170. № 3. P. 365–371.
21. Hu B., Han W., Wu L. et al. // Radiat. Res. 2005. V. 164. № 3. P. 286–291.
22. Leonard B.E. // Int. J. Radiat. Biol. 2007. V. 83. № 7. P. 479–489.
23. Xu B., Kim S.T., Lim D.S. et al. // Mol. Cell. Biol. 2002. V. 22. № 4. P. 1049–1059.
24. Short S.C., Woodcock M., Marples B. et al. // Int. J. Radiat. Biol. 2003. V. 79. № 2. P. 99–105.
25. Shmakova N., Fadeeva T., Krasavin E. et al. // Nukleonika. 1999. V. 44. № 4. P. 539–548.
26. Shmakova N.L., Fadeeva T.A., Nasonova E.A. et al. // Radiats. Biol. Radioecol. 2002. V. 42. № 3. P. 245–250.
27. Nasonova E.A., Shmakova N.L., Komova O.V. et al. // Radiat. Environ. Biophys. 2006. V. 45. № 4. P. 307–312.
28. Eccles L.J., O'Neill P., Lomax M.E. // Mutat. Res. 2011. V. 711. № 1–2. P. 134–141.
29. Grudzinski S., Raths A., Conrad S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 32. P. 14205–14210.

Поступила в редакцию
27.06.2011

DNA Double-Strand Breaks in Human Lymphocytes after Single Irradiation by Low Doses of Pulsed X-Rays: Non-Linear Dose-Response Relationship

S. A. Vasilyev¹, E. Yu. Stepanova², O. P. Kutenkov³, A. A. Belenko², L. P. Zharkova^{2,3},
M. A. Bol'shakov^{2,3}, I. N. Lebedev¹, V. V. Rostov³

¹Institute of Medical Genetics, Siberian Division of Russian Academie of Sciences,
Tomsk, 634050 Russia; e-mail: stas.vasilyev@gmail.com

²Tomsk State University, Tomsk

³Institute of High Current Electronics, Siberian Division of Russian Academie of Sciences, Tomsk

Effects of ionizing radiation registered in cells after low dose irradiation are still poorly understood. A pulsed mode of irradiation is even more problematic in terms of predicting the radiation-induced response in cells. Thus, the aim of this paper was to study and analyze the effects of dose and frequency of pulsed X-rays on the frequency of radiation-induced DNA double-strand breaks and their repair kinetics in human peripheral blood lymphocytes in vitro. Analysis of radiation-induced γ H2AX and 53BP1 repair foci was used to assess the DNA damage in these cells. The dose-response curve of radiation-induced foci of both proteins has shown deviations from linearity to a higher effect in the 12–32 mGy dose range and a lower effect at 72 mGy. The dose-response curve was linear at doses higher than 100 mGy. The number of radiation-induced γ H2AX and 53BP1 foci depended on the frequency of X-ray pulses: the highest effect was registered at 13 pulses per second. Moreover, slower repair kinetics was observed for those foci induced by very low doses with a non-linear dose-response relationship.