

УДК 577.2:611.018.53:539.1.047

ФОНОВОЕ КОЛИЧЕСТВО ФОКУСОВ γ H2AX В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

© 2015 г. С. А. Васильев^{1,2,*}, А. И. Величевская², Т. В. Вишневская², А. А. Беленко²,
О. В. Грибова³, М. Б. Плаксин⁴, Ж. А. Старцева³, И. Н. Лебедев^{1,2}

¹НИИ медицинской генетики, Томск

²Томский государственный университет, Томск

³Томский НИИ онкологии, Томск

⁴Клиническая больница № 81 ФМБА России, Северск

Фоновый уровень повреждений ДНК и радиочувствительность клеток человека характеризуются значительной межиндивидуальной вариабельностью. Фосфорилирование гистона H2AX (γ H2AX) в клетках приводит к включению сигнальной системы, направленной на репарацию двунитевых разрывов ДНК, запуск клеточного старения и активацию контрольных точек клеточного цикла. При этом остается неясной природа фоновых фокусов γ H2AX и их влияния на клеточную радиочувствительность и эффективность восстановления радиационно-индуцированных повреждений ДНК в клетках человека. В работе у 54 здоровых индивидов проведен анализ связи фонового количества фокусов γ H2AX в лимфоцитах периферической крови с частотой индуцированных *in vitro* (2 Гр) центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер. Обнаружена обратная корреляция между спонтанным количеством фокусов γ H2AX и уровнем центромеро-негативных микроядер после облучения. Соответствующие корреляции между спонтанным количеством фокусов белка 53BP1 и частотами центромеро-негативных микроядер оказались статистически незначимыми. Кроме того, клетки индивидов с высокой частотой радиационно-индуцированных микроядер характеризовались также низкой частотой пролиферативной активности. Эндогенные фокусы γ H2AX представляют собой собранные комплексы, состоящие из белков репарации двунитевых разрывов ДНК и сигнальных медиаторов, участвующих в активации контрольных точек клеточного цикла. По-видимому, у индивидов с низким спонтанным количеством фокусов γ H2AX система репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК работает менее эффективно и большее число двунитевых разрывов ДНК после воздействия ионизирующего излучения остается нерепарированным. Это приводит как к нарушению клеточного деления в части клеток, так и к потере фрагментов хромосом в виде центромеро-негативных микроядер в ходе митоза в клетках, завершивших деление.

Двунитевые разрывы ДНК, репарация ДНК, фокусы γ H2AX, микроядра, лимфоциты периферической крови человека, индивидуальная радиочувствительность, FISH.

DOI: 10.7868/S0869803115040128

Фоновый уровень повреждений ДНК в клетках человека характеризуется значительной вариабельностью. В основе таких межиндивидуальных различий лежат, с одной стороны, генетические причины, такие как мутации и полиморфизмы генов репарации ДНК, детоксикации ксенобиотиков, антиоксидантной защиты [1]. С другой стороны, фоновое количество повреждений ДНК определяется уровнем мутагенной нагрузки, которой подвергаются клетки человека.

В ответ на индукцию двунитевых разрывов ДНК в результате воздействия ионизирующего излучения и других мутагенов, включая продукты окислительного стресса, в клетках включаются сигнальные системы, направленные на репарацию повреждений ДНК и активацию контрольных точек клеточного цикла. Недавно была предложена новая чувствительная методика определения числа двунитевых разрывов ДНК, основанная на анализе белков, участвующих в репарации этих разрывов. В клетке в ходе ответа на действие ионизирующего излучения наблюдается образование так называемых радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК [2]. Они являются динамическими структурами, содержащими тысячи копий белков, участвующих в

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

различных этапах репарации двунитевых разрывов ДНК и передаче сигналов. Эти структуры могут оцениваться микроскопически в виде дискретных фокусов, окружающих двунитевые разрывы ДНК. Среди белков, участвующих в образовании радиационно-индуцированных фокусов, особое значение придается фосфорилированному гистону H2AX (γ H2AX) [3]. Так как число радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX тесно связано с количеством двунитевых разрывов, принято считать, что фокусы γ H2AX локализируются в местах двунитевых разрывов ДНК [4].

Образование в клетках фокусов белков репарации ДНК приводит к включению сигнальной системы, направленной на запуск клеточного старения [5], активацию контрольных точек клеточного цикла [6] и репарацию повреждений ДНК. Однако остается неясной степень сопряженности количества фоновых фокусов белков репарации ДНК с клеточной радиочувствительностью и эффективностью восстановления радиационно-индуцированных повреждений в клетках человека. Поэтому цель настоящей работы заключалась в анализе связи фонового количества фокусов белков репарации ДНК с индивидуальной радиочувствительностью клеток человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Для достижения цели исследования использовались лимфоциты периферической крови 54 жителей г. Томска и г. Северска мужского пола, не связанных в ходе профессиональной деятельности с действием радиации. Средний возраст обследованных лиц составлял 37.6 ± 13.1 лет (24–72 года). От каждого индивида было получено письменное согласие на проведение исследования и собраны анкетные данные.

От каждого индивида на базе клиники НИИ медицинской генетики (г. Томск) был произведен забор 18 мл крови в вакуумные пробирки, покрытые натриевой солью гепарина (Vacuette, “Greiner”, Германия). Кровь в одной из пробирок подвергали воздействию γ -излучения ^{60}Co в дозе 2 Гр, другой образец от того же индивида являлся контрольным. Облучение производили с помощью гамма-терапевтического аппарата “Theratron Equinox” (“Best Theratronics”, Канада) на базе Томского НИИ онкологии (мощность дозы – 0.67 Гр/мин). В необлученных лимфоцитах периферической крови каждого донора анализировали количество фокусов белков γ H2AX и 53BP1 и частоту микроядер, тогда как в облученных клетках проводилась оценка только частоты микроядер.

Анализ фокусов белков γ H2AX и 53BP1. Лимфоциты из периферической крови выделяли с помо-

щью центрифугирования в градиенте фиколл-верографина ($\rho = 1.077$) (“ПанЭко”, Россия). После выделения клетки наносили на предметные стекла, покрытые полилизинном для улучшения адгезии (“Menzel”, Германия). Препараты накрывали покровным стеклом и оставляли на 10 мин, после чего покровное стекло удаляли и препараты фиксировали в 3%-ном растворе параформальдегида в течение 20 мин при 4°C. После дальнейшей отмывки в фосфатном буфере (PBS) проводили пермеабиллизацию в 0.2%-ном растворе Triton X-100 (“Sigma”, США) в течение 10 мин при 4°C. Затем препараты отмывали в трех сменах PBS по 5 мин 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”, Канада) и поликлональные антитела кролика к белку 53BP1 (“Novus”, Канада). Вторичными антителами, несущими флуорохромы, были мышинные антитела к иммуноглобулинам кролика (“Novus”, Канада), конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), и кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши (“Novus”, Канада), конъюгированные с родамином. На препараты наносили по 50 мкл раствора первичных антител в 3% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, “HyClone”, США) в концентрации 1 : 400 и 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% FBS (1 : 400). Затем отмывые в трех сменах PBS по 5 мин препараты окрашивали раствором DAPI в составе буфера для микроскопирования Vectashield (“VectorLabs”, США). Поле, в котором проходило иммунное окрашивание, накрывали покровным стеклом. Препараты хранили до микроскопирования в темноте при 4°C.

Визуализация флуоресцентных сигналов осуществлялась на микроскопе Axio Imager Z2 (“Zeiss”, Германия) с автоматической системой регистрации препаратов Metafer (“Metasystems”, Германия) при увеличении в 1000 раз. Съемка производилась 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. На красном и зеленом фильтрах получали изображения с 15 фокальных плоскостей с шагом в 0.5 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

производили оценку количества фокусов белков γ H2AX, 53BP1 и колокализованных фокусов обоих белков в 100–200 клетках. Подсчет фокусов на полученных изображениях производили вручную.

Анализ частоты микроядер. Получение двухъядерных клеток проводилось по стандартному протоколу [7]. 1.0–1.5 мл цельной крови культивировали при 37°C в питательной среде RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Нус-Clone”, США) и раствор аминокислот (“Sigma”, США). В каждый флакон для стимуляции деления лимфоцитов вносили по 6 мл среды и 50 мкл фитогемаглютинаина (“ПанЭко”, Россия). Для накопления цитокинез-блокированных клеток в культуры лимфоцитов на 44-м ч культивирования добавляли цитохалазин В (“Sigma”, США) до конечной концентрации 6 мкг/мл. На 72-м ч культивирования производили фиксацию клеток модифицированным фиксатором Карнуа (метанол:уксусная кислота – 3 : 1).

Для каждой полученной клеточной суспензии производили анализ пролиферативной активности, оцениваемой как доля лимфоцитов, прошедших деление в культуре (2-, 3- и 4-ядерные), относительно всех жизнеспособных клеток на препаратах, окрашенных красителем Гимза.

Анализ частоты микроядер проводили в комбинации с флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH), что позволило отдельно оценить частоту центромеро-негативных микроядер, содержащих ацентрические фрагменты хромосом, и частоту центромеро-позитивных микроядер, являющихся следствием потерь центрических фрагментов или целых хроматид/хромосом в ходе деления клеток в культуре.

Для получения ДНК-зондов использовали амплифицированный фрагмент ДНК прицентромерных α -сателлитных повторов человека, полученный в реакции ПЦР с помощью специфичных праймеров [8]. Постановку реакции FISH осуществляли в соответствии со следующим протоколом. Препарат проводили через три смены 2 \times SSC по 5 мин при 37°C с последующей инкубацией в 0.01% растворе пепсина 10 мин при 37°C. Затем производили постфиксацию клеток в 0.5%-ном растворе параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. После отмывки в течение 5 мин в растворе PBS препарат последовательно помещали в три стакана (по 5 мин в каждом), содержащие этанол разной концентрации, а именно, возрастающей от 70–80 до 100%. После этого препарат подсушивали в термостате при 37°C. На стекло наносили 10 мкл гибридизационной смеси (5 мкл 100%-ного формамида, 2.5 мкл 50%-ного декстрансульфата, 1 мкл ДНК спермы лосося в конечной концентрации

0.1 мкг/мкл). После этого проводили денатурацию с последующей гибридизацией ДНК-зондов с хромосомными мишенями в течение 15–18 ч при 37°C во влажной камере с подогревом для проведения FISH-анализа ThermoBrite (“Abbott Molecular”, США). После отмывки неспецифически связавшегося ДНК-зонда в двух растворах: 0.4 \times SSC, 0.3% NP-40 (“Amresco”, США) при 70°C 2 мин и 2 \times SSC, 0.1% NP-40 (“Amresco”, США) при 37°C 5 мин препараты заключали в среду Vectashield (“VectorLab”, США) с одновременной окраской DAPI и накрывали покровным стеклом. Визуализацию флуоресцентных сигналов осуществляли на микроскопе Axio Imager Z2 (“Zeiss”, Германия) при увеличении $\times 63$ с использованием светофильтров, специфичных к пропусканию спектра испускания красителей DAPI и TAMRA.

В качестве нормы рассматривались клетки без микроядер с большим количеством флуоресцентных сигналов в ядрах. Для каждой исследуемой точки оценивали частоту микроядер на 1000 двухъядерных лимфоцитов периферической крови индивида. Аномальными считались клетки с микроядрами, характеризующимися наличием центромерного сигнала (центромеро-позитивные микроядра), что является следствием отставания отдельных хроматид в клеточном делении, а также с центромеро-негативными микроядрами, содержащими ацентрические фрагменты – результат кластогенного воздействия радиации.

Статистическая обработка. Для корреляционного анализа использовали непараметрический критерий Спирмана. Сравнение частоты микроядер в облученных и необлученных клетках производили с помощью критерия Вилкоксона. Все статистические процедуры были проведены с помощью программного обеспечения Statistica 8.0 (Statsoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота фокусов γ H2AX в необлученных лимфоцитах в группе исследованных индивидов составляла 0.30 ± 0.19 на 1 клетку, тогда как средний уровень фокусов белка 53BP1 имел более высокое значение – 1.23 ± 0.81 фокусов на клетку. При этом наблюдалась значимая корреляция количества фокусов γ H2AX и 53BP1 в лимфоцитах периферической крови одних и тех же индивидов ($n = 31$, $R = 0.48$, $p = 0.006$) (рис. 1). Несмотря на это, только 12.3% фокусов γ H2AX были колокализованы с фокусами 53BP1, что соответствует ранее полученным данным [9] и, по-видимому, характерно для лимфоцитов периферической крови человека.

Спонтанная частота микроядер в необлученных лимфоцитах периферической крови обсле-

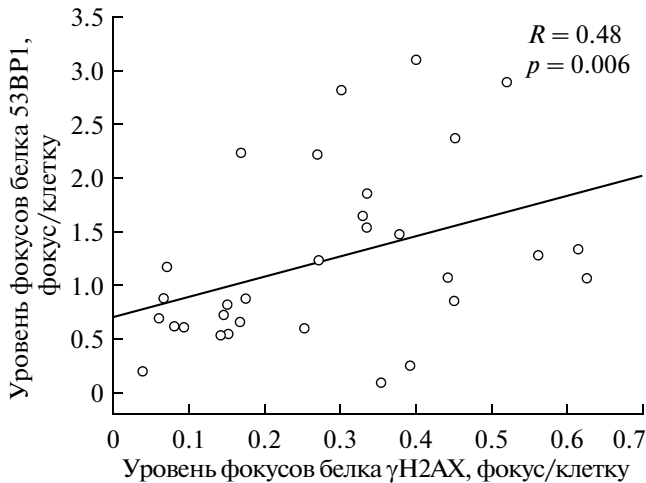


Рис. 1. Корреляция между спонтанными количествами фокусов белков γ H2AX и 53BP1 в лимфоцитах периферической крови обследованных индивидов.

дованных индивидов составляла $5.9 \pm 2.2\%$. При этом уровни центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер составили соответственно 3.8 ± 1.8 и $2.1 \pm 1.7\%$. После облучения клеток крови *in vitro* в дозе 2 Гр общая частота микроядер возрастала до $111.7 \pm 43.1\%$, а уровни центромеро-негативных и центромеро-позитивных микроядер составили 105.6 ± 41.9 и $6.1 \pm 6.5\%$ соответственно (рис. 2). Повышение было статистически значимым для частоты и центромеро-негативных, и центромеро-позитивных микроядер ($n = 37, p < 0.000001$ и $n = 37, p = 0.0002$ соответственно).

Не выявлено статистически значимой корреляционной связи между спонтанной и радиационно-индуцированной частотой центромеро-негативных микроядер ($n = 37, R = 0.29, p = 0.087$). При этом отмечена слабая ассоциативная связь между уровнями центромеро-позитивных микроядер в контрольных и облученных образцах ($n = 37, R = 0.42, p = 0.01$) (рис. 3).

Заслуживает внимания обнаруженная обратная корреляция спонтанной частоты фокусов γ H2AX с уровнем центромеро-негативных микроядер после облучения ($n = 37, R = -0.37, p = 0.025$) (рис. 4, Б). При этом корреляция спонтанного количества фокусов γ H2AX с частотой центромеро-негативных микроядер в необлученных лимфоцитах периферической крови была незначимой ($n = 46, R = -0.22, p = 0.14$) (рис. 4, А). Соответствующие корреляции между спонтанным уровнем фокусов белка 53BP1 и частотами центромеро-негативных микроядер в интактных и облученных *in vitro* лимфоцитах оказались статистически незначимыми ($n = 31, R = 0.11, p = 0.56$ и $n = 23, R = -0.21, p = 0.33$ соответственно) (рис. 4, В, Г). В норме лимфоциты периферической крови находятся в стадии покоя, однако небольшая доля клеток может находиться в S- и G₂-фазе. В этих клетках может быть повышено количество фокусов белков репарации ДНК и потенциально они могут влиять на оценку средней частоты фокусов в клетках [10]. Однако в настоящей работе распределение фокусов γ H2AX в клетках не отличалось значимо от ожидаемого распределения Пуассона (рис. 5), что указывает на незначительный вклад делящихся клеток в рассматриваемый эффект.

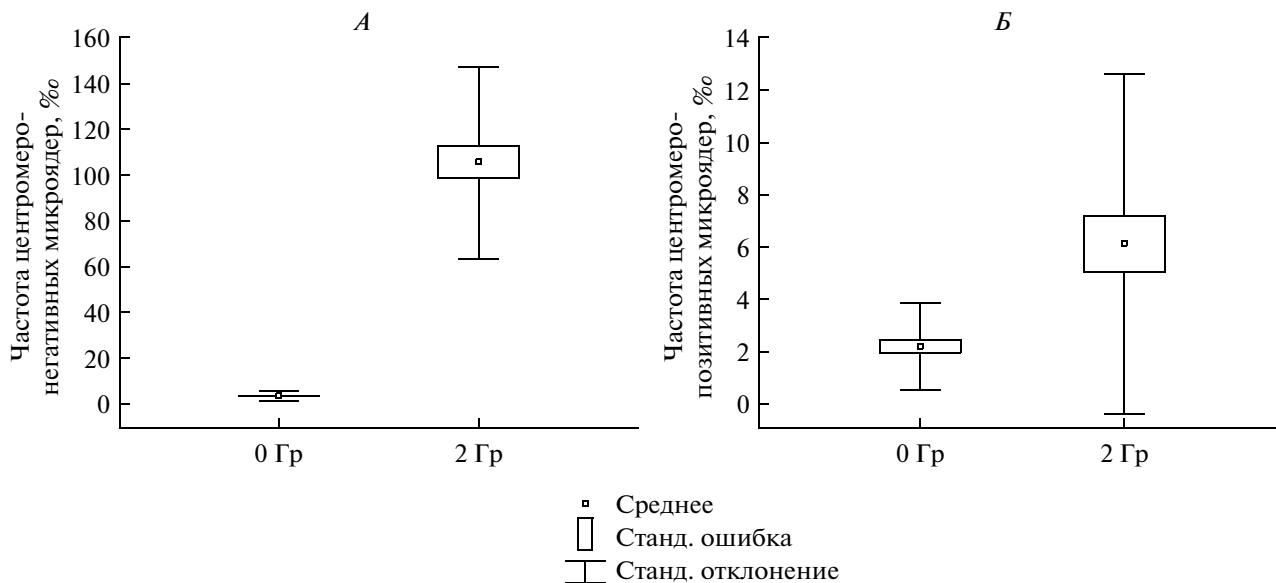


Рис. 2. Частоты центромеро-негативных (А) и центромеро-позитивных микроядер (Б) в лимфоцитах периферической крови обследованных индивидов в контрольных образцах и после воздействия γ -излучением *in vitro* в дозе 2 Гр.

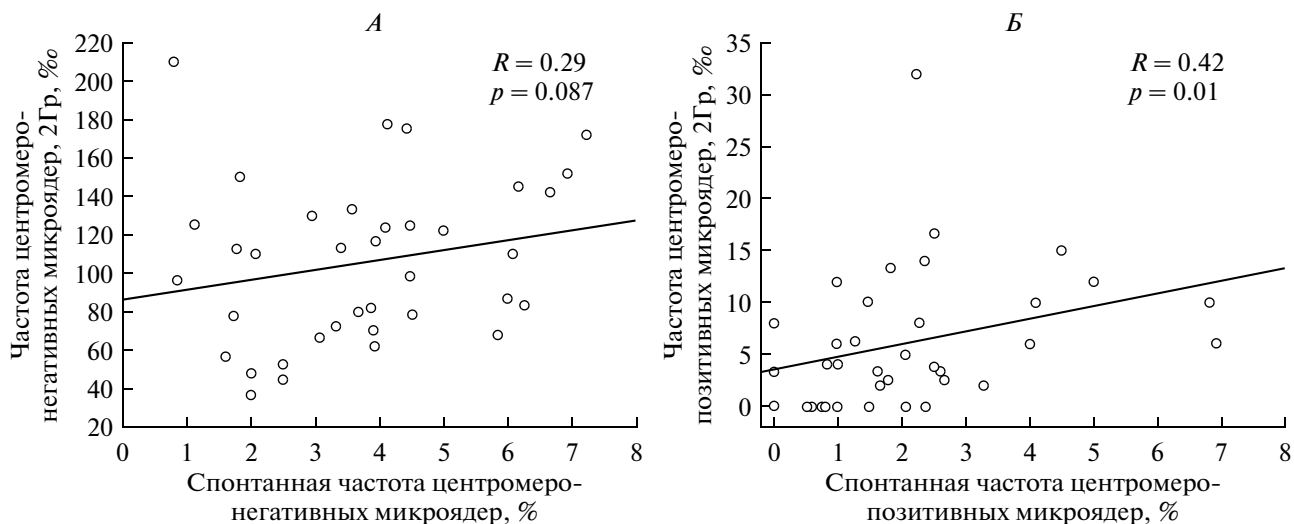


Рис. 3. Зависимость частоты центромеро-негативных (А) и центромеро-позитивных (Б) микроядер в лимфоцитах периферической крови человека после воздействия в дозе 2 Гр *in vitro* от частоты соответствующих хромосомных нарушений в контроле.

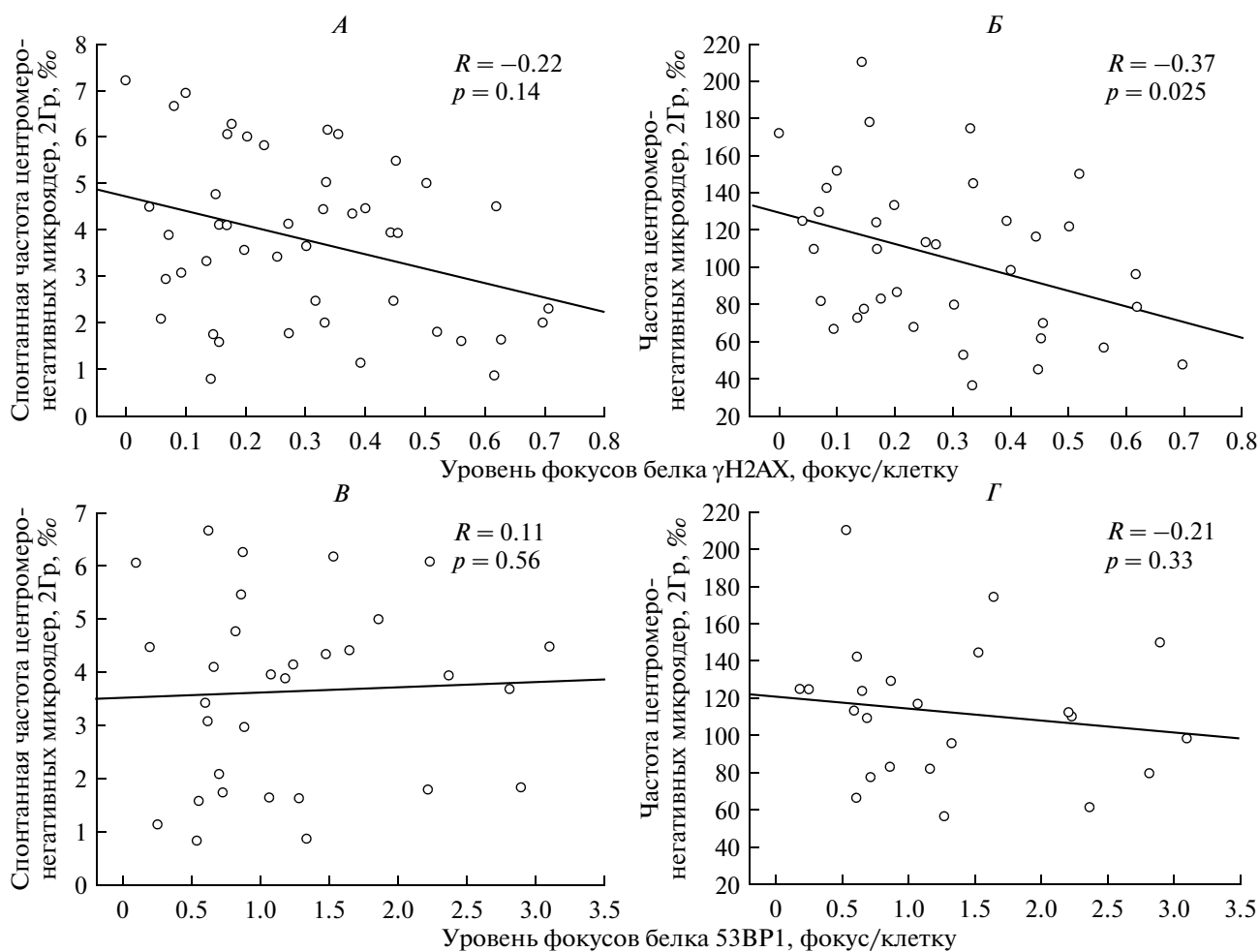


Рис. 4. Зависимость спонтанной и радиационно-индуцированной частоты центромеро-негативных микроядер в лимфоцитах периферической крови человека от количества фокусов белков γ H2AX (А, Б) и 53BP1 (В, Г) в необлученных клетках.

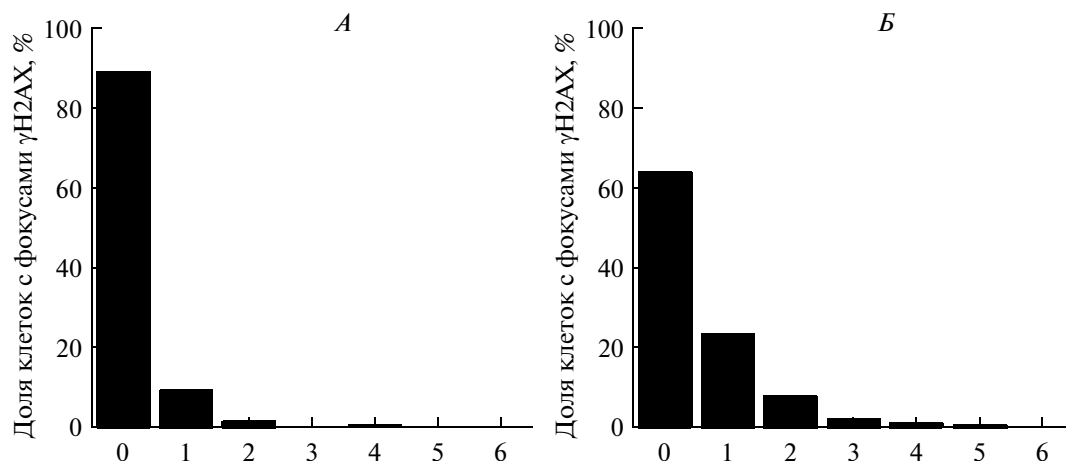


Рис. 5. Примеры распределения клеток по количеству фокусов γ H2AX у индивидов с низким средним спонтанным уровнем фокусов и высокой частотой радиационно-индуцированных микроядер (А) и высоким средним спонтанным уровнем фокусов и низкой частотой радиационно-индуцированных микроядер (Б).

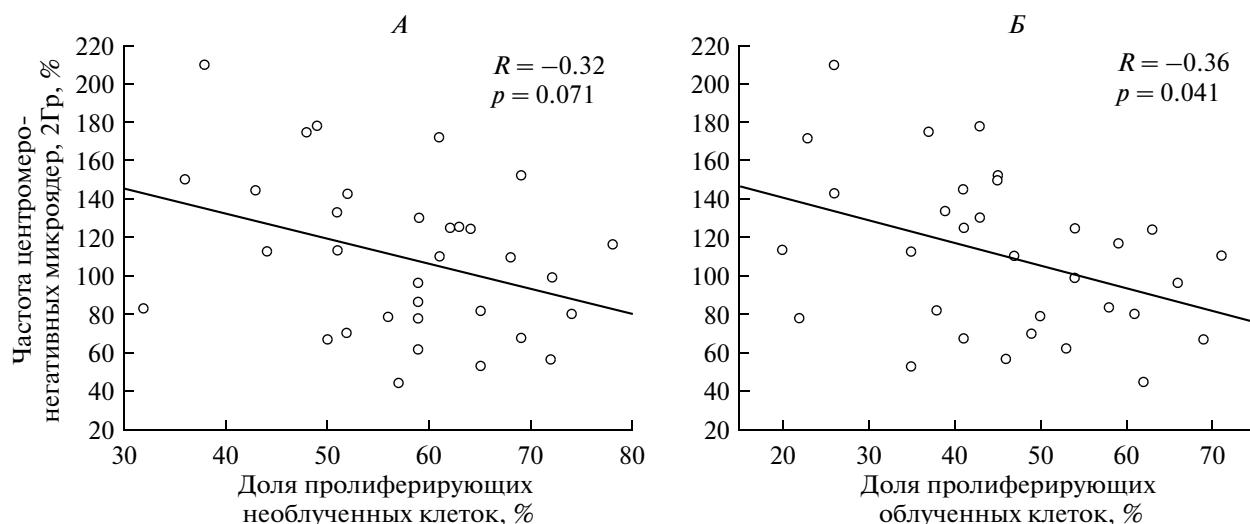


Рис. 6. Зависимость частоты центромеро-негативных микроядер в лимфоцитах периферической крови обследованных индивидов после воздействия ионизирующего излучения в дозе 2 Гр *in vitro* от пролиферативной активности лимфоцитов (А – контроль и Б – после облучения *in vitro*) тех же лиц.

Кроме того, с целью оценки пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови в культуре была определена доля делящихся клеток, представляющая собой отношение суммы двухъядерных и многоядерных клеток к общему количеству лимфоцитов. Пролиферативная активность лимфоцитов, т.е. доля делящихся клеток, статистически значимо снижалась после облучения *in vitro* и составляла $45.4 \pm 13.1\%$, тогда как таковой показатель в популяции интактных клеток составил $57.1 \pm 11.5\%$ ($p = 0.00001$). При этом обнаружена значимая обратная корреляция между долей делящихся облученных клеток и частотой центромеро-негативных микроядер после радиационного воздействия ($n = 32$, $R = -0.36$,

$p = 0.041$) (рис. 6). Также наблюдалась аналогичная сопряженность доли делящихся необлученных клеток с частотой центромеро-негативных микроядер после воздействия радиации, однако она была статистически незначимой ($n = 33$, $R = -0.32$, $p = 0.071$). Корреляции доли делящихся клеток со спонтанным количеством фокусов γ H2AX и 53BP1 обнаружено не было.

Не было обнаружено значимого влияния возраста индивидов на количество фокусов γ H2AX и 53BP1 ($R = 0.25$, $p = 0.09$ и $R = -0.03$, $p = 0.87$ соответственно), а также на пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови в культуре ($R = 0.09$, $p = 0.55$) и частоту микроядер в них ($R = 0.15$, $p = 0.31$). Кроме того, не было от-

мечено значимых различий по фиксируемым показателям между курящими и некурящими индивидами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Фоновый уровень повреждений ДНК в клетках человека является интегральной характеристикой величины мутагенной нагрузки и способности системы репарации ДНК справляться с такой нагрузкой. Известными факторами, влияющими на вариабельность спонтанного уровня повреждений ДНК в лимфоцитах периферической крови человека, являются возраст индивидов [11, 12] и наличие хронических заболеваний [13, 14]. Однако в настоящей работе не было обнаружено значимого влияния возраста и курения как на спонтанное количество фокусов γ H2AX и 53BP1, так и на спонтанную и индуцированную при облучении *in vitro* частоту микроядер в лимфоцитах периферической крови человека.

Воздействие ионизирующего излучения на лимфоциты периферической крови человека *in vitro* прогнозируемо приводило к повышению частоты центромеро-негативных микроядер, содержащих хромосомные фрагменты, что соответствует классическому кластогенному действию радиации. Кроме того, повышалась и частота центромеро-позитивных микроядер, отражающая уровень хромосомного отставания, что указывает на существование анеугенного эффекта радиации, продемонстрированного ранее в основном в условиях хронического облучения *in vivo* [15, 16]. В его основе могут лежать как нарушения целостности центромерного района хромосом, так и окислительные повреждения ДНК и белкового аппарата сегрегации хромосом в митозе [16].

Наиболее интересным результатом, полученным в настоящем исследовании, является обратная зависимость частоты индуцированных микроядер в лимфоцитах периферической крови человека после воздействия радиации *in vitro* от спонтанного количества фокусов γ H2AX в клетках этих же индивидов до облучения. Кроме того, частота индуцированных *in vitro* микроядер оказалась обратно пропорциональна пролиферативной активности лимфоцитов. Это указывает на наличие цитостатического эффекта в клетках крови индивидов, характеризующихся высокой чувствительностью лимфоцитов к тестирующему облучению *in vitro*.

Хромосомные аберрации и микроядра, наблюдаемые в клетках в ходе митотического деления, являются следствием отсутствия репарации или неправильной репарации двунитевых разрывов ДНК. Действительно, ранее в лимфоцитах периферической крови семи больных с опухолями мо-

лочной железы была обнаружена значимая корреляция между количеством радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX и частотой хромосомных делеций после облучения *in vitro* [17]. С другой стороны, в лимфоцитах 27 больных с опухолями шейки матки и эндометрия не отмечалось значимой корреляции количества радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX с частотой хроматидных аберраций после облучения в фазе G_2 клеточного цикла [18].

Природа эндогенных фокусов γ H2AX не до конца понятна. С одной стороны, они могут маркировать нерепарированные двунитевые разрывы ДНК, возникшие в результате воздействия окислительных агентов или других факторов внутренней среды организма [19]. С другой стороны, отмечается, что эти фокусы могут сохраняться в местах изменения структуры хроматина после завершения репарации двунитевых разрывов ДНК [20, 21], либо соответствовать укороченным теломерам [6, 22]. Фактически, они представляют собой собранные комплексы, состоящие из белков репарации двунитевых разрывов ДНК и сигнальных медиаторов, участвующих в активации компонентов контрольных точек клеточного цикла.

Возможно, что чем больше в клетках фокусов γ H2AX до облучения, тем лучше в них работает система распознавания и репарации двунитевых разрывов ДНК после воздействия ионизирующего излучения. Это приводит к тому, что большая часть клеток завершает деление в культуре после облучения *in vitro* и в них образуется меньшее число центромеро-негативных микроядер, представляющих собой нерепарированные двунитевые разрывы ДНК. Наоборот, у индивидов с низким спонтанным количеством фокусов γ H2AX система репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК работает хуже и большее число двунитевых разрывов ДНК после воздействия ионизирующего излучения остается нерепарированным, приводя как к нарушению клеточного деления в части клеток, так и к потере фрагментов хромосом в виде центромеро-негативных микроядер в ходе митоза в клетках, завершивших деление.

Несмотря на значимую корреляцию между числом фокусов γ H2AX и 53BP1, не было обнаружено связи между количеством фокусов 53BP1 и частотой радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер. Фокусы белка 53BP1 выполняют в первую очередь функцию медиатора, передающего сигнал на сверточную точку G_1/S , блокируя прохождение клеточного цикла при наличии большого количества повреждений ДНК [23]. Кроме того, степень ко-локализации фокусов 53BP1 и γ H2AX сильно отличается в различных типах клеток [9, 24] и, по-видимому, на-

прямую не связана с эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК. Учитывая отсутствие корреляции между количеством фокусов 53BP1 и частотой радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер (но, при этом, наблюдаемой для фокусов γ H2AX), обнаруженный в настоящей работе эффект реализуется в первую очередь не за счет работы контрольных точек или блокировки прохождения клеточного цикла или апоптоза, а скорее зависит от эффективности распознавания и репарации двунитевых разрывов ДНК у конкретного индивида.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента № МК-14.122.13.6806 и гранта РФФИ № 14-04-31867.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chua M.L., Rothkamm K.* Biomarkers of radiation exposure: can they predict normal tissue radiosensitivity? // *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol)*. 2013. V. 25. № 10. P. 610–616.
2. *Bekker-Jensen S., Lukas C, Kitagawa R. et al.* Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks // *J. Cell Biol.* 2006. V. 173. № 2. P. 195–206.
3. *Beiyayev I.Y.* Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry // *Mutat. Res.* 2010. V. 704. № 1–3. P. 132–141.
4. *Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G. et al.* Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody // *Radiat. Res.* 2002. V. 158. № 4. P. 486–492.
5. *Nakamura A.J., Chiang Y.J., Hathcock K.S. et al.* Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence // *Epigenetics Chromatin*. 2008. V. 1. № 1. P. 6.
6. *Fumagalli M., Rossiello F., Clerici M., et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation // *Nat. Cell Biol.* 2012. V. 14. № 4. P. 355–365.
7. *Fenech M.* Cytokinesis-block micronucleus cytome assay // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. № 5. P. 1084–1104.
8. *Mutter J., Decordier I, Hoet P.H. et al.* Clastogenic and aneuploid effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells // *Carcinogenesis*. 2008. V. 29. № 2. P. 427–433.
9. *Vasilyev S.A., Kubes M., Markova E. et al.* DNA damage response in CD133 + stem/progenitor cells from umbilical cord blood: low level of endogenous foci and high recruitment of 53BP1 // *Int. J. Radiat. Biol.* 2013. V. 89. № 4. P. 301–309.
10. *Martin O.A., Ivashkevich A., Choo S. et al.* Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity // *DNA Repair (Amst)*. 2013. V. 12. № 10. P. 844–855.
11. *Sedelnikova O.A., Horikawa I., Redon C. et al.* Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging // *Aging Cell*. 2008. V. 7. № 1. P. 89–100.
12. *Fenech M., Bonassi S.* The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes // *Mutagenesis*. 2011. V. 26. № 1. P. 43–49.
13. *Andreassi M.G., Barale R., Iozzo P. et al.* The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease // *Mutagenesis*. 2011. V. 26. № 1. P. 77–83.
14. *Migliore L., Coppede F., Fenech M. et al.* Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases // *Mutagenesis*. 2011. V. 26. № 1. P. 85–92.
15. *Васильев С.А., Тимошевский В.А., Лебедев И.Н.* Цитогенетические механизмы генерации анеуплоидии в соматических клетках работников ядерно-химического производства с инкорпорированным плутонием-239 // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 11. С. 1565–1570.
16. *Васильев С.А., Тимошевский В.А., Лебедев И.Н.* Анеуплоидный эффект ионизирующего излучения в соматических клетках млекопитающих и человека // *Генетика*. 2009. Т. 45. № 12. С. 1589–1599.
17. *Chua M.L., Somaiah N., A'Hern R. et al.* Residual DNA and chromosomal damage in ex vivo irradiated blood lymphocytes correlated with late normal tissue response to breast radiotherapy // *Radiother. Oncol.* 2011. V. 99. № 3. P. 362–366.
18. *Werbrouck J., De Ruyck K., Beels L., et al.* Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: potential of the gamma-H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity // *Oncol. Rep.* 2010. V. 23. № 2. P. 571–578.
19. *Sedelnikova O.A., Horikawa I., Zimonjic D.B. et al.* Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks // *Nat. Cell Biol.* 2004. V. 6. № 2. P. 168–170.
20. *Han J., Hendzel M.J., Allalunis-Turner J.* Quantitative analysis reveals asynchronous and more than DSB-associated histone H2AX phosphorylation after exposure to ionizing radiation // *Radiat. Res.* 2006. V. 165. № 3. P. 283–292.
21. *Kato T.A., Okayasu R., Bedford J.S.* Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and gamma-H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells // *Mutat. Res.* 2008. V. 639. № 1–2. P. 108–112.
22. *Nakamura A.J., Redon C.E., Bonner W.M. et al.* Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells // *Aging (Albany NY)*. 2009. V. 1. № 2. P. 212–218.
23. *Panier S., Boulton S.J.* Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 1. P. 7–18.
24. *Markova E., Schultz N., Belyaev I.Y.* Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival // *Int. J. Radiat. Biol.* 2007. V. 83. № 5. P. 319–329.

Поступила в редакцию
6.10.2014

Background Level of γ H2AX Foci in Human Cells as a Factor of Individual Radiosensitivity

S. A. Vasilyev^{1,2}, A. I. Velichevskaya², T. V. Vishnevskaya², A. A. Belenko², O. V. Gribova³,
M. B. Plaksin⁴, Zh. A. Startseva³, I. N. Lebedev^{1,2}

¹*Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia;*

e-mail: stanislav.vasilyev@medgenetics.ru

²*Tomsk State University, Tomsk,*

³*Tomsk Cancer Research Institute, Tomsk*

⁴*Clinical Hospital 81 FMBA of Russia, Seversk*

The paper analyzes the effects of spontaneous level of γ H2AX and 53BP1 foci on a frequency of radiation-induced centromere-negative and centromere-positive micronuclei in peripheral blood lymphocytes of 54 healthy individuals after exposure to 2 Gy of ionizing radiation *in vitro*. An inverse correlation was found between the level of spontaneous γ H2AX foci and the frequency of centromere-negative micronuclei after irradiation. The corresponding correlations between the spontaneous level of protein 53BP1 foci and the frequency of centromere-negative micronuclei were not statistically significant. In addition, cells of the individuals with a high frequency of radiation-induced micronuclei were also characterized by a low proliferative activity. It was suggested that DNA double strand break repair works less efficiently in cells of the individuals with low levels of spontaneous γ H2AX foci, and a greater number of DNA double strand breaks after exposure to ionizing radiation remains unrepaired, thus leading to a cell cycle block and an increase of the frequency of centromere-negative micronuclei.