

4. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study / S. Bonassi, A. Abbondandolo, L. Camurri [et al.] // *Cancer Genetic and Cytogenetic*. 1995. Vol. 79, Issue 2. P. 133–135.
5. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens / S. Bonassi, L. Hagmar, U. Strömberg [et al.] // *Cancer Research*. 2000. Vol. 60, № 6. P. 1619–1625.
6. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH) / L. Hagmar, S. Bonassi, U. Strömberg [et al.] // *Cancer Research*. 1998. Vol. 58, № 18. P. 4117–4121.
7. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts / L. Hagmar, U. Strömberg, S. Bonassi [et al.] // *Cancer Research*. 2004. Vol. 64, № 6. P. 2258–2263.
8. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer / P. Rossner, P. Boffetta, M. Ceppi [et al.] // *Environmental Health Perspectives*. 2005. Vol. 113, № 5. P. 517–520.
9. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from central Europe / P. Boffetta, O. van der Hel, H. Norppa [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* 2007. Vol. 165, № 1. P. 36–43.
10. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries / S. Bonassi, H. Norppa, M. Ceppi [et al.] // *Carcinogenesis*. 2008. Vol. 29, № 6. P. 1178–1183.
11. Bonassi S., El-Zein R., Bolognesi C., Fenech M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies // *Mutagenesis*. 2011. Vol. 26, Issue 1. P. 93–100.
12. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans / S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi [et al.] // *Carcinogenesis*. 2007. Vol. 28, № 3. P. 625–631.
13. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk / H. Norppa, S. Bonassi, I.-L. Hansteen [et al.] // *Mutation Research*. 2006. Vol. 600, Issues 1–2. P. 37–45.
14. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area / S.-H. Liou, J.-C. Lung, Y.-H. Chen [et al.] // *Cancer Research*. 1999. Vol. 59, № 7. P. 1481–1484.
15. Intra- and interindividual variability in lymphocyte chromosomal aberrations: implications for cancer risk assessment / S. Peters, L. Portengen, S. Bonassi [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* 2011. Vol. 174, Issue 4. P. 490–403.
16. Increased chromosomal instability in peripheral lymphocytes and risk of human gliomas / R. El-Zein, M.L. Bondy, Li-E. Wang [et al.] // *Carcinogenesis*. 1999. Vol. 20, № 5. P. 811–815.
17. El-Zein R., Gu Y., Sierra M.S. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes and risk of prostate cancer // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005. Vol. 14, № 3. P. 748–752.
18. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk / R. El-Zein, M.B. Schabath, C.J. Etzel [et al.] // *Cancer Research*. 2006. Vol. 66, № 12. P. 6449–6456.
19. Cytogenetic studies in lymphocytes of patients with rectal cancer / E. Gebhart, R. Romahn, A. Schneider [et al.] // *Environmental Health Perspectives Supplements*. 1993. Vol. 101, Suppl. 3. P. 169–175.
20. Kulusayin Ozar M. Ö., Orta T. The use of chromosome aberrations in predicting breast cancer risk // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 24, № 2. P. 217–222.
21. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes and risk for non-Hodgkin lymphoma / S. S. Wang, S. Davis, P. Hartge [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2008. № 39. P. 78–82.
22. Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions / X. Wu, S. M. Lippman, J. J. Lee [et al.] // *Cancer Research*. 2002. Vol. 62, № 10. P. 2813–2818.
23. Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients / A. Hille, H. Hofman-Hüther, E. Kühnle [et al.] // *Radiat. Environ. Biophys.* 2010. Vol. 49, № 1. P. 27–37.
24. Kaur P., Sambyal V. Lymphocytic chromosomal instability in sporadic gastrointestinal tract (GIT) cancer patients and their first-degree relatives // *Int. J. Hum. Genet.* 2008. Vol. 8, № 4. P. 335–342.
25. Higher frequency of dicentrics and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of cancer patients / P. Venkatachalam, S. F. D. Paul, M. N. Mohankumar [et al.] // *Mutat. Res.* 1999. Vol. 425, № 1. P. 1–8.
26. Chodick G., Bhatti P., Sigurdson A. J. Re: «Chromosomal aberrations and cancer risk» results of a cohort study from central Europe // *Am. J. Epidemiol.* 2007. Vol. 166, № 2. P. 239–240.
27. Vorobcova I.E., Semenov A.V. Kompleksnaja citogeneticheskaja harakteristika lic, postradavshih v rezul'tate avarii na Chernobyl'skoj AJeS // *Radiacionnaja biologija. Radioekologija*. 2006. T. 46, № 2. S. 140–152.
28. Vorobcova I.E., Semenov A.V. Chastota hromosomnyh aberracij v limfocitah cheloveka kak pokazatel' riska zaboлеваemosti // *Medicinskij akademicheskij zhurnal*. 2008. № 4. S. 45–49.
29. Sravnitel'nyj analiz citogeneticheskikh pokazatelej s morfo-funkcional'nym sostojaniem shhitovidnoj zhelezy u detej i podrostkov, prozhivajushhix s momenta avarii na Chernobyl'skoj AJeS na zagraznennyh radionuklidami territorijah Orlovskoj i Kaluzhskoj oblastej / A.V. Sevan'kaev, V.S. Parshin, G.F. Miha-jlova [i dr.] // *Radiacija i risk*. 2006. T. 15, № 1/2. S. 134–145.

УДК 577.2.043:539.1

Оригинальная статья

ИНДУКЦИЯ И РЕПАРАЦИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК В КЛЕТКАХ ЛИНИИ V79 ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО γ -ИЗЛУЧЕНИЯ

И. В. Озеров — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», младший научный сотрудник; **А. Ю. Бушманов** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», заместитель генерального директора, профессор, доктор медицинских наук; **Н. А. Анчишкина** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», научный сотрудник, кандидат биологических наук; **Д. В. Гурьев** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук; **М. В. Пустовалова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», инженер; **Н. М. Сметанина** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», младший научный сотрудник; **Е. Ю. Архангельская** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; **Н. Ю. Воробьева** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр

им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; **А. Н. Осипов** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», заведующий лабораторией, доктор биологических наук.

INDUCTION AND REPARATION OF DOUBLE-STRAND DNA BREAKS IN V79 CELLS CONTINUOUSLY EXPOSED TO LOW DOSE-RATE γ -RADIATION

I. V. Ozerov — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, junior researcher; **A. Yu. Bushmanov** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, vice director, Professor, Doctor of Medical Science; **N. A. Anchishkina** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, researcher, Candidate of Biological Sciences; **D. V. Guryev** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, leading researcher, Candidate of Biological Sciences; **M. V. Pustovalova** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, technician; **N. M. Smetanina** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, junior researcher; **E. Yu. Arkhangelskaya** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, senior researcher, Candidate of Biological Sciences; **N. Yu. Vorobyeva** — State Scientific Research Center n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, senior researcher, Candidate of Biological Sciences; **A. N. Osipov** — State Scientific Research Center — n.a. A. I. Burnasyan — Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, head of laboratory, Doctor of Biological Sciences.

Дата поступления — 18.11.2013 г.

Дата принятия в печать — 16.12.2013 г.

Озеров И. В., Бушманов А. Ю., Анчишкина Н. А., Гурьев Д. В., Пустовалова М. В., Сметанина Н. М., Архангельская Е. Ю., Воробьева Н. Ю., Осипов А. Н. Индукция и репарация двунитевых разрывов ДНК в клетках линии V79 при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 4. С. 787–791.

Цель: изучить закономерности изменений количества двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках млекопитающих при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения. **Материал и методы.** В работе использовали культуру фибробластов легкого китайского хомячка (линия V79). Облучение клеток γ -лучами при мощности дозы 0,1 мГр/мин проводили на установке «Гамма-Панорама» (Cs-137). Для оценки изменений количества ДР ДНК использовали иммунофлуоресцентный анализ фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ -H2AX). Частоту апоптотических клеток определяли методом «ДНК-гало». Для анализа продукции активных форм кислорода (АФК) использовали 5 (6) — хлорметил-2,7-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат. **Результаты.** Протестировано, что при длительном низкоинтенсивном облучении клеток линии V79 в ранние сроки облучения (6–24 ч, дозы 3,6–14,4 сГр) наблюдается увеличение количества фокусов γ -H2AX и продукции АФК, а в более поздние сроки (48–72 ч, дозы 28,8–43,2 сГр) снижение этих показателей практически до контрольного уровня. Статистически достоверных изменений доли апоптотических клеток при этом обнаружено не было. **Заключение.** Процессы, обуславливающие изменения количества ДР ДНК в клетках млекопитающих при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения, по всей видимости, сопряжены с развитием оксидативного стресса и последующей активизацией антиоксидантных защитных систем клеток.

Ключевые слова: двунитевые разрывы ДНК, фокусы γ -H2AX, апоптоз, активные формы кислорода, γ -излучение, низкая мощность дозы, клетки V79.

Ozerov I. V., Bushmanov A. Yu., Anchishkina N. A., Guryev D. V., Pustovalova M. V., Smetanina N. M., Arkhangelskaya E. Yu., Vorobyeva N. Y., Osipov A. N. Induction and reparation of double-strand DNA breaks in V79 cells continuously exposed to low dose-rate γ -radiation // *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2013. Vol. 9, № 4. P. 787–791.

Aim: to study the patterns of changes in the number of DNA double-strand breaks (DSB) in mammalian cells continuously exposed to low dose-rate γ -radiation. **Material and methods.** Chinese hamster lung fibroblasts (V79) were used in this study. The γ -irradiation of cells at a dose rate of 0.1 mGy/min was performed using the «Gamma-Panorama» unit (Cs-137). The fluorescence immunoassay of the phosphorylated H2AX-histone (γ -H2AX) foci was used to investigate the DNA DSBs formation. Frequency of apoptotic cells was evaluated using «DNA halo» assay. 5 (6) — chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate was used to estimate the reactive oxygen species (ROS) production. **Results.** It was showed that continuous low dose-rate irradiation of Chinese hamster V79 cells induces an increase of the γ -H2AX foci number and ROS production rate at the early stages of exposure time (6–24 h, doses 3.6–14.4 cGy), while increasing exposition time and, therefore, the radiation dose (48–72 h, 28.8–43.2 cGy) caused a decrease in these endpoints to almost the control level. There was observed no significant changes in the frequency of apoptotic cells. **Conclusion.** It is assumed that the processes causing the DSB amount changes in mammalian cells continuously exposed to low dose-rate γ -radiation are associated with the development of oxidative stress and subsequent activation of cellular antioxidant defense systems.

Key words: DNA double-strand breaks, γ -H2AX foci, apoptosis, reactive oxygen species, γ -radiation, low dose-rate, V79 cells.

Введение. Большая часть повреждений, возникающих в ДНК клеток после воздействия ионизирующего излучения (ИИ), существенно отличается по своей химической природе от эндогенных повреждений [1]. Важнейшей характеристикой радиационно-индуцированных повреждений ДНК является их сложность и кластеризация [2]. Среди повреждений ДНК, вызываемых ИИ, двунитевые разрывы (ДР) ДНК являются наиболее критическими для дальнейшей

судьбы клетки. Предполагается, что именно ДР являются основным триггером, запускающим процессы клеточного отклика на воздействие ионизирующего излучения [3]. Репарация ДР происходит довольно медленно, в то время как ДР, не устраненные в ходе репарации ДНК, приводят к серьезным цитогенетическим нарушениям, гибели клеток, инактивации генов супрессоров опухолей или активации онкогенов [4]. Основные закономерности индукции и репарации ДР довольно хорошо изучены при остром, кратковременном воздействии ИИ в различных дозах [5]. Однако в реальных условиях живые организмы, как правило, подвергаются не острому, а длительному /

Ответственный автор — Осипов Андреян Николаевич
Адрес: 123182, г. Москва, ул. Живописная, 46.
Тел: +79154373245.
E-mail: andreyan.osipov@gmail.com

хроническому воздействию ИИ. К сожалению, существующие в настоящее время экспериментальные данные об особенностях изменения количества ДР в клетках млекопитающих при длительном / хроническом воздействии ИИ немногочисленны и крайне противоречивы [6].

Цель работы: изучение закономерностей изменений количества ДР ДНК в клетках китайского хомяка линии V79 при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения.

Материал и методы. В работе использовали культуру фибробластов легкого китайского хомячка (линия V79). Клетки обладают довольно высокой адгезивной способностью к лабораторному пластику. Клетки культивировали в стандартной полной среде DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, 1% L-глутамина и антибиотики (пенициллин и стрептомицин) в условиях стандартного CO_2 -инкубатора при 37°C в атмосфере с 5%-м содержанием CO_2 .

Облучение клеток при мощности дозы 0,1 мГр/мин проводили на специально переоборудованной для облучения культур клеток облучательной установке «Гамма-Панорама» (источник γ -излучения Cs-137).

Для анализа фокусов γ -H2AX использовали методику, описанную в работе [7]. Коротко: клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (2% в трис-буфере, pH 7,4), промывали трис-буфером, пермеабелизировали холодным (-20°C) метанолом в течение 1 мин и помещали на 20 мин в трис-буфер, содержащий 4% фетальной телячьей сыворотки и 0,1% Тритон-X100. Слайды инкубировали с моноклональными антителами к белку γ -H2AX (Anti-phospho-Histone H2A.X Rabbit Monoclonal, Merck-Millipore) при 4°C в течение ночи, после чего промывали и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом (Goat anti-Rabbit IgG (H+L), FITC conjugate, Merck-Millipore), при комнатной температуре в течение 1 ч ДНК окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (0,5 мкг/мл, 5 мин). Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Axioscop-40 FL (Carl Zeiss), оснащенный видеокамерой высокого разрешения AxioCamMRc 5 (Carl Zeiss) с помощью программы AxioVision 4.8 (Carl Zeiss). Подсчитывали не менее 100 клеток на точку.

Частоту апоптотических клеток определяли методом «ДНК-гало» [8]. Принцип метода состоит в том, что низкомолекулярные фрагменты ДНК, образующиеся в процессе апоптотической межнуклеосомной деградации ДНК, легко диффундируют в гель агарозы, образуя характерное «гало» вокруг ядерной области клетки. Коротко: 10 мкл суспензии клеток (1 млн клеток/мл) смешивали со 100 мкл 0,5%-го раствора легкоплавкой агарозы (тип IV) в фосфатно-солевом буфере при температуре 37°C и наносили на предварительно покрытые 1%-м слоем нормоплавкой агарозы предметные стекла. Лизис клеток проводили в холодном (4°C) лизирующем буфере (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 10,0, 1% Triton X-100) в течение 2 ч. После окраски слайдов флуоресцентным красителем SYBR Green I (Invitrogen) анализ уровня клеточной гибели осуществляли на люминесцентном микроскопе Axioscop-40 FL (Carl Zeiss), оснащенный видеокамерой высокого разрешения AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss).

Для анализа продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках использовали краситель

5(6)-хлорметил-2,7-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат (Invitrogen), считающийся маркером внутриклеточных АФК [9]. Этот препарат легко проникает через клеточную мембрану, в клетке гидролизует эстеразами и далее окисляется до флуоресцирующего соединения. Суспензию клеток (1 млн/мл) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) инкубировали с препаратом в течение 60 мин. Измерения интенсивности флуоресценции проводили на флуориметре с длиной волны возбуждения 488 нм и эмиссией 525–530 нм.

Статистическую обработку результатов всех измерений проводили с помощью программы Statistica 7.0. Результаты представлены как среднее трех независимых экспериментов \pm стандартная ошибка. Для оценки достоверности отличий использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты. Для оценки изменений количества ДР ДНК использовали иммунофлуоресцентный анализ фокусов фосфорилированного корового гистона H2AX (γ -H2AX). Фосфорилирование H2AX осуществляется киназами ATM, ATR и DNA-ПК в ответ на образование ДР и свидетельствует о его распознавании [10]. При этом образуются динамические микроструктуры, содержащие тысячи копий γ -H2AX, получивших в литературе название «фокусы γ -H2AX» [11]. Полагают, что один фокус γ -H2AX соответствует одному ДР ДНК [12]. Ранее нами было показано, что через 30 мин после острого облучения количество фокусов γ -H2AX в клетках линии V79 линейно зависит от дозы облучения [7].

Предполагается, что «пороговой» дозой для индукции репарации ДР является доза в несколько сГр [13]. В связи с этим нами проведены исследования динамики изменений количества фокусов γ -H2AX в диапазоне доз 3,6–43,2 сГр при мощности дозы облучения 0,1 мГр/мин. Результаты исследований, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что динамика изменений количества фокусов γ -H2AX при низкой мощности дозы существенно отличается от эффектов, наблюдаемых нами ранее на тех же клетках при облучении с высокой мощностью дозы (4000 мГр/мин) [7]. Если при облучении с высокой мощностью наблюдалось зависящее от дозы увеличение количества фокусов γ -H2AX, то при мощности дозы 0,1 мГр/мин характер изменений количества фокусов γ -H2AX необычен: в ранние сроки облучения (6–24 ч, дозы 3,6–14,4 сГр) наблюдается незначительное увеличение количества фокусов, в то время как увеличение времени и, соответственно, дозы облучения (48–72 ч, дозы 28,8–43,2 сГр) вызывало неожидан-

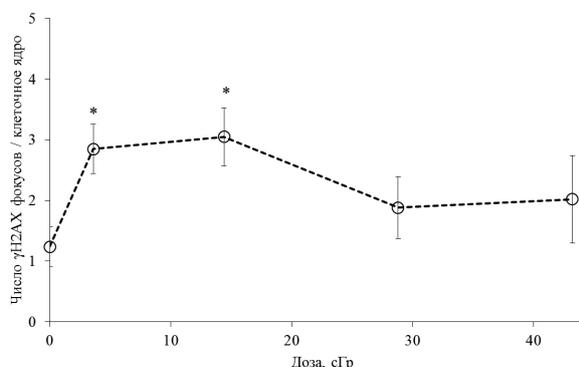


Рис. 1. Изменения количества фокусов γ -H2AX в клетках линии V79 при облучении с мощностью дозы γ -излучения 0,1 мГр/мин
Примечание: * — отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$

ное снижение количества фокусов γ -H2AX практически до контрольного уровня. Полученные результаты могут свидетельствовать в пользу гипотезы индуцибельного характера репарации ДР в клетках млекопитающих при длительном воздействии низкоинтенсивного ионизирующего излучения.

Образование фокусов γ -H2AX происходит не только при индукции ДР повреждающими агентами, но и в процессе апоптоза. Показано, что киназа DNA-PK фосфорилирует гистон H2AX в процессе межнуклеосомной деградации хроматина [14]. В связи с этим было важно оценить возможный вклад апоптоза в индукции фокусов γ -H2AX при длительном низкоинтенсивном облучении клеток. Результаты, представленные на рис. 2, показали, что при облучении клеток линии V79 при мощности дозы 0,1 мГр/мин не отмечается увеличения доли апоптотических клеток в течение 72 ч облучения (рис. 2).

Другим процессом, индуцирующим образование фокусов γ -H2AX при длительном низкоинтенсивном облучении, является окислительный стресс. Прямая индукция ДР при атаке ДНК свободными радикалами — довольно редкое событие, наблюдаемое при образовании близлежащих одонитивных разрывов (ОР) на противоположных нитях ДНК [9]. Известно, что соотношение ДР/ОР при атаке ДНК свободными радикалами составляет $\sim 1/2000$ – $1/3250$, тогда как при воздействия ионизирующего излучения оно равно $\sim 1/25$. [9]. Однако ДР могут образовываться при коллапсе репликативных вилок, когда они достигают области одонитивного разрыва [10]. В результате фокусы γ -H2AX могут индуцироваться в клетках при повышенной продукции АФК. Действительно, результаты измерений продукции АФК в клетках линии V79, облученных при мощности дозы 0,1 мГр/мин, показывают, что характер изменений продукции АФК схож с изменением количества фокусов γ -H2AX в этих клетках (рис. 3).

Обсуждение. При анализе полученных нами результатов прежде всего обращает на себя внимание пороговость наблюдаемого эффекта. Снижение уровня ДР ДНК наблюдается после облучения в дозе ~ 15 сГр. Это наводит на мысль, что после достижения определенного количества ДР ДНК происходит активизация индуцибельных систем клеточного отклика на повреждения. Подобные результаты были получены нами ранее в экспериментах на мышах. Было показано, что при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения в дозах 14–43 сГр в начальные сроки облучения в клетках селезенки и лейкоцитах крови животных наблюдается незначительное увеличение количества ДР, после чего с увеличением продолжительности облучения и, соответственно, накопленной дозы, происходит неожиданное снижение их количества [6]. Результаты исследований Коллис и др. [15] свидетельствуют о том, что активация АТМ-киназы на повреждение ДНК и формирование фокусов γ -H2AX в клетках, облученных при низкой мощности дозы, значительно ниже, чем в клетках, подвергнутых облучению в эквивалентной дозе, но при высокой мощности дозы. Возможно, что активация систем клеточного отклика на повреждения ДНК при малом количестве ДР ДНК не происходит. Об индуцибельном характере отклика клеток на радиационно-индуцированные ДР ДНК свидетельствуют также результаты работы Грудзенски и др. [13]. Было показано, что первичные фибробласты человека не в состоянии репарировать ДР ДНК, возникающие в результате воздействия радиации в дозе

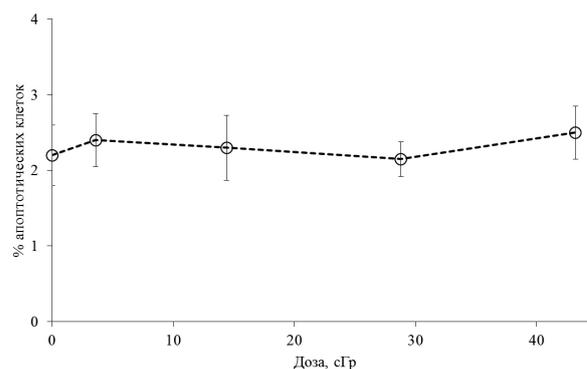


Рис. 2. Изменения доли апоптотических клеток в культуре клеток линии V79, облучаемой при мощности дозы 0,1 мГр/мин

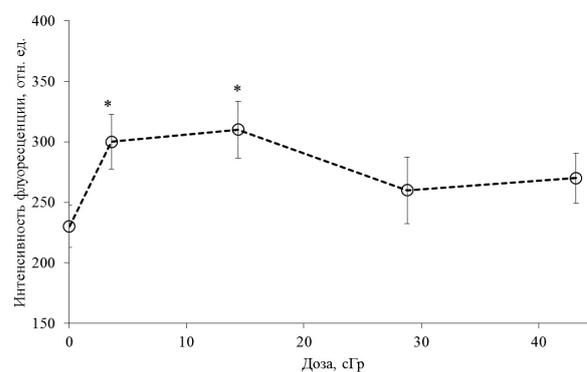


Рис. 3. Продукция активных форм кислорода в клетках линии V79 при облучении с мощностью дозы 0,1 мГр/мин. Примечание: * — отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$

1 мГр в течение длительного времени. Однако клетки могут эффективно восстанавливать эти разрывы, если клетки предварительно обрабатывать 10 мкМ H_2O_2 до облучения. В той же работе было показано, что в клетках тканей мышей после их облучения в малой дозе (1 сГр), но не после умеренной (10 сГр) или высокой дозы (1 Гр), не наблюдалось снижения количества фокусов γ -H2AX и 53BP1 в течение 24 ч.

С другой стороны, наблюдаемый в нашей работе эффект увеличения количества ДР в начальные сроки низкоинтенсивного облучения с последующим их снижением в более поздние сроки может быть обусловлен не индукцией репарации ДР, а развитием окислительного стресса с последующей активацией антиоксидантных защитных систем клеток. Впрочем, не исключено, что в данном случае мы имеем дело с параллельно индуцируемыми процессами. Для идентификации механизмов наблюдаемых эффектов необходимы дальнейшие исследования.

Закключение. Показано, что при облучении клеток китайского хомяка линии V79 с мощностью дозы 0,1 мГр/мин в ранние сроки облучения (6–24 ч, дозы 3,6–14,4 сГр) наблюдается увеличение количества фокусов γ -H2AX, а в более поздние сроки (48–72 ч, дозы 28,8–43,2 сГр) — снижение практически до контрольного уровня. Наблюдаемый эффект не сопровождается изменением доли апоптотических клеток, однако результаты измерений продукции АФК показывают, что их характер схож с изменением количества фокусов γ -H2AX в этих клетках. Сделано заключение о том, что процессы, обуславливающие изменения количества ДР ДНК в клетках млекопита-

ющих при длительном воздействии низкоинтенсивного γ -излучения, по всей видимости, сопряжены с развитием оксидативного стресса и последующей активизацией антиоксидантных защитных систем клеток.

Конфликт интересов. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-01733-а).

Библиографический список

- Jeggo P. A., Löbrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability // *DNA Repair (Amst)*. 2006. Vol. 5 (9-10). P. 1192–1198.
- Sutherland B. M., Bennett P. V., Sidorkina O., Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39 (27). P. 8026–8033.
- Goodarzi A. A., Jeggo P., Löbrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax // *DNA Repair (Amst)*. 2010. Vol. 9 (12). P. 1273–1282.
- Halazonetis T. D., Gorgoulis V. G., Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development // *Science*. 2008. Vol. 319 (5868). P. 1352–1355.
- Mladenov E., Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways // *Mutat. Res*. 2011. Vol. 711 (1-2). P. 61–72.
- Osipov A. N., Buleeva G., Arkhangelskaya E., Klokov D. In vivo γ -irradiation low dose threshold for suppression of DNA double strand breaks below the spontaneous level in mouse blood and spleen cell. // *Mutat. Res*. 2013. Vol. 756 (1-2). P. 141–145.
- Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ -radiation with different dose rates / K. V. Kotenko, A. Y. Bushmanov, I. V. Ozerov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. 2013. Vol. 14, № 7. P. 13719–13726.
- Singh N. P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells // *Exp. Cell Res*. 2000. Vol. 256 (1) P. 328–337.
- Osipov A. N., Lizunova E. Yu., Gur'ev D. V., Vorob'eva N. Yu. Genome Damage and Reactive Oxygen Species Production in the Progenies of Irradiated CHO-K1 Cells // *Biophysics*. 2011. Vol. 56, № 5. P. 931–935.
- GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization / M. Löbrich, A. Shibata, A. Beucher [et al.] // *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9 (4). P. 662–669.
- 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 [et al.] // *Curr Biol*. 2000. Vol. 10 (15). P. 886–895.
- Sharma A., Singh K., Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage // *Methods Mol. Biol*. 2012. Vol. 920. P. 613–626.
- Grudzinski S., Raths A., Conrad S., Rube C. E., Löbrich M. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107 (32). P. 14205–14210.
- DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells / B. Mukherjee, C. Kessinger, J. Kobayashi [et al.] // *DNA Repair (Amst)*. 2006. Vol. 5 (5). P. 575–590.
- Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage / S. J. Collis, J. M. Schwaninger, A. J. Ntambi [et al.] // *J. Biol. Chem*. 2004. Vol. 279 (48). P. 49624–49632.

Translit

- Jeggo P. A., Löbrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability // *DNA Repair (Amst)*. 2006. Vol. 5 (9-10). P. 1192–1198.
- Sutherland B. M., Bennett P. V., Sidorkina O., Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39 (27). P. 8026–8033.
- Goodarzi A. A., Jeggo P., Löbrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax // *DNA Repair (Amst)*. 2010. Vol. 9 (12). P. 1273–1282.
- Halazonetis T. D., Gorgoulis V. G., Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development // *Science*. 2008. Vol. 319 (5868). P. 1352–1355.
- Mladenov E., Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways // *Mutat. Res*. 2011. Vol. 711 (1-2). P. 61–72.
- Osipov A. N., Buleeva G., Arkhangelskaya E., Klokov D. In vivo γ -irradiation low dose threshold for suppression of DNA double strand breaks below the spontaneous level in mouse blood and spleen cell. // *Mutat. Res*. 2013. Vol. 756 (1-2). P. 141–145.
- Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ -radiation with different dose rates / K. V. Kotenko, A. Y. Bushmanov, I. V. Ozerov [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. 2013. Vol. 14, № 7. P. 13719–13726.
- Singh N. P. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells // *Exp. Cell Res*. 2000. Vol. 256 (1) P. 328–337.
- Osipov A. N., Lizunova E. Yu., Gur'ev D. V., Vorob'eva N. Yu. Genome Damage and Reactive Oxygen Species Production in the Progenies of Irradiated CHO-K1 Cells // *Biophysics*. 2011. Vol. 56, № 5. P. 931–935.
- GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization / M. Löbrich, A. Shibata, A. Beucher [et al.] // *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9 (4). P. 662–669.
- 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 [et al.] // *Curr Biol*. 2000. Vol. 10 (15). P. 886–895.
- Sharma A., Singh K., Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage // *Methods Mol. Biol*. 2012. Vol. 920. P. 613–626.
- Grudzinski S., Raths A., Conrad S., Rube C. E., Löbrich M. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107 (32). P. 14205–14210.
- DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells / B. Mukherjee, C. Kessinger, J. Kobayashi [et al.] // *DNA Repair (Amst)*. 2006. Vol. 5 (5). P. 575–590.
- Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage / S. J. Collis, J. M. Schwaninger, A. J. Ntambi [et al.] // *J. Biol. Chem*. 2004. Vol. 279 (48). P. 49624–49632.

УДК 577.34: 577.344

Оригинальная статья

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЫХОДА ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ И ЩЕЛОЧНОЛАБИЛЬНЫХ САЙТОВ ДНК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ 365 НМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЙ НА ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Н. М. Сметанина — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», младший научный сотрудник; **М. В. Пустовалова** — ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна Федерального медико-биологического агентства», инженер; **А. Ю. Бушманов** —