

На правах рукописи



ГРЕХОВА АННА КОНСТАНТИНОВНА

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

03.01.01 – Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Научный руководитель:

Осипов Андреян Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий отделом экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Официальные оппоненты:

Петин Владислав Георгиевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом исследования комбинированных воздействий и биофизической лабораторией Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Посыпанова Галина Ароновна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «31» января 2019 года в 12 часов 00 минут на заседании Диссертационного совета Д 462.001.04 по адресу: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

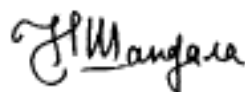
Тел. +7(495)190-96-98

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России

Автореферат разослан « 29 » ноября 2018 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета, Д 462.001.04,
доктор медицинских наук



Н.К.Шандала

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время довольно хорошо изучены последствия, вызываемые облучением в больших дозах (свыше 1000 мГр): морфофункциональные изменения, лучевая болезнь, которая в тяжелом варианте завершается летальным исходом, канцерогенез, старение. Однако, по-прежнему, отсутствует единая точка зрения о биологических эффектах, вызываемых облучением в малых (от 10 до 100 мГр) дозах. С одной стороны, среди полезных, положительных эффектов облучения в малых дозах называют радиационный гормезис [Кузин А.М., 1991] и феномен адаптивного ответа [Olivieri G., 1984; Филиппович И.В., 1991]. С другой стороны, существуют эпидемиологические данные, свидетельствующие об увеличении риска возникновения онкологических заболеваний (стохастические эффекты) после воздействия острого облучения в дозах выше 50 мГр или хронического в дозе 100 мГр [Brenner D.J., 2003], а также медицинских диагностических процедур, в частности, компьютерной томографии [Нан М.А., 2018]. В этой связи, изучение биологических эффектов действия малых доз ионизирующего излучения (ИИ) становится особенно актуальным, поскольку использование ионизирующей радиации в медицинских целях составляет около 95% [UNSCEAR, 2000].

На молекулярном уровне одной из основных мишеней ИИ является информационная макромолекула - ДНК. Ионизирующее излучение вызывает разнообразные повреждения ДНК: модификации оснований, однонитевые и двунитевые разрывы, апуриновые и апиримидиновые сайты (АП-сайты), ДНК-белковые сшивки, сшивки ДНК-ДНК и др. [Ward J.F., 1988]. Среди этих повреждений двунитевые разрывы (ДР) ДНК являются наиболее критическими для дальнейшей судьбы клетки. Именно они запускают процессы клеточного ответа на воздействие ИИ [Goodarzi A.A., 2010]. Изучение механизмов возникновения и репарации этих повреждений остается актуальной проблемой.

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

Степень разработанности темы

Большое число исследований посвящено изучению закономерностей индукции ДР и их репарации при использовании ИИ в больших дозах [Mladenov E., 2011; Martin O.A., 2013; Заднепрянец М.Г., 2018]. Известно, что выводы об опасности облучения в малых дозах формировались за счет экстраполяции эффектов, полученных в результате воздействия больших доз, поскольку отсутствовали чувствительные методы регистрации эффектов, вызываемых ИИ в малых дозах.

В последние десятилетия стали активно развиваться высокочувствительные методы косвенной оценки изменений количества ДР в живых клетках, основанные на иммуноцитохимическом анализе белков, участвующих в репарации ДР ДНК [Sollazzo

А., 2018]. Образующиеся во время репарации ДНК от ДР сложные динамические микроструктуры, состоящие из тысяч копий белков, визуализируются после иммуноцитохимического окрашивания в виде ярких точек, из-за чего получили в литературе название фокусов белков репарации. Количественный и качественный анализ фокусов белков репарации в настоящее время считается самым чувствительным методом анализа повреждений ДНК и широко используется для изучения закономерностей индукции и репарации ДР ДНК. Анализ изменения количества фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в качестве биологического маркера ДР ДНК нашел широкое применение в различных биологических исследованиях, в частности, в радиационной биодозиметрии [Garty G., 2010] и оценке индивидуальной радиочувствительности [Васильев С.А., 2015]. Иммуноцитохимический метод анализа фокусов белков репарации позволяет детектировать увеличение количества ДР ДНК при малых и средних дозах облучения, а также определять расположение белков репарации относительно ДР ДНК в ядре клетки.

Цели и задачи

Цель работы состояла в изучении закономерностей образования и репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных рентгеновским излучением в малых и средних дозах в фибробластах кожи человека *in vitro*.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Установить зависимость между дозой рентгеновского облучения и количеством фокусов белков репарации γ H2AX и pATM в интервале доз 20-1000 мГр.
2. Сравнить динамику изменений количества фокусов белков репарации γ H2AX, pATM и Rad51 в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в малых и средних дозах.
3. Оценить влияние пролиферативной активности и фазы клеточного цикла на возникновение и деградацию фокусов белков репарации.
4. Определить вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после облучения в малых и средних дозах.

Научная новизна

- Впервые на несинхронизированной популяции фибробластов кожи человека путем детального (по минутам и часам в течение первых суток) изучения кинетики возникновения и репарации двунитевых разрывов ДНК установлено, что абсолютное и относительное количество фокусов γ H2AX, pATM и Rad51 через 24 ч в клетках, облученных в дозах малого (20 – 80 мГр) диапазона было выше, чем после воздействия ИИ в средних дозах (160 – 1000 мГр).
- Увеличение количества фокусов белков репарации через 24 ч после облучения клеток в дозах малого диапазона связано с образованием их *de novo* в результате стимуляции пролиферативной активности фибробластов.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

При изучении закономерностей индукции и репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК в несинхронизированной клеточной популяции необходимо учитывать разнонаправленное - стимулирующее (для малых доз) или ингибирующее (для средних доз) действие ИИ в пролиферирующих клетках. Увеличение количества фокусов γ H2AX, регистрируемых через «длительное» время после облучения (24 ч) за счет их образования *de novo* в результате клеточной пролиферации, может приводить к ошибочному заключению о повышенном риске при облучении в малых дозах, что может свидетельствовать о более эффективной репарации ДР ДНК после облучения в малых дозах и о возможном отсутствии негативных эффектов в результате данного воздействия. Это особенно важно при оценке воздействия ИИ в малых дозах во время проведения диагностических радиологических процедур (компьютерная томография, магниторезонансная томография, рентгенологические исследования).

Фокусы фосфорилированного корового гистона H2AX рекомендуются нами в диапазоне доз от 20-1000 мГр в качестве возможного радиационного биологического маркера для определения поглощенной дозы, поскольку установлена линейная зависимость между количеством фокусов γ H2AX и дозой рентгеновского излучения.

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

Методология и методы исследования

В работе использованы современные методы исследований. Оценку индукции и репарации ДР ДНК проводили с использованием иммуноцитохимического окрашивания клеток при помощи антител, специфичных к белкам, участвующим в процессах репарации ДР. Для идентификации ДР ДНК, индуцированных ИИ, использовали антитела к фосфорилированному по серину-139 гистону H2AX. Для анализа фокусов активного/фосфорилированного АТМ (pАТМ) использовали первичные антитела к pАТМ. АТМ является основной киназой, фосфорилирующей гистон H2AX в областях хроматина, прилегающих к ДР, индуцированных ионизирующим излучением. Для анализа фокусов ключевого белка гомологичной рекомбинации использовали первичные антитела к белку Rad51. Анализ клеточной пролиферации и клеток в S/G2 фазах проводили с использованием антител к белкам

Ki67 и CENPF, соответственно. Белок Ki67 является маркером клеточной пролиферации (присутствует в клеточном ядре в делящихся клетках в фазах G1, S, G2, M и отсутствует в покоящихся – в фазе G0). Белок CENPF является маркером клеток в S/G2 фазах.

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

Экспериментальная работа была выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Положения, выносимые на защиту

1. Стимуляция пролиферативной активности клеток облучением в малой дозе существенно влияет на количество фокусов белков репарации (γ H2AX, pATM) в несинхронизированной клеточной популяции.
2. Повышенный уровень фокусов белков репарации через 24 ч после облучения несинхронизированной популяции фибробластов в дозах малого диапазона связан с образованием их *de novo*.
3. Вклад гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК в первые сутки после облучения фибробластов в дозах малого диапазона был выше, чем после воздействия рентгеновского излучения в дозах среднего диапазона.

Степень достоверности и апробация результатов

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

Материалы диссертации были представлены на Третьей Международной конференции по радиации и ее применению в различных областях исследований RAD 2015 (Будва, Черногория, 2015), Научной сессии НИЯУ МИФИ-2015 (Москва, 2015), XX ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва, 2015), 42-й Конференции Европейского общества радиационных исследований (Амстердам, Нидерланды, 2016), Международном научно-практическом форуме «Ядерные технологии на страже здоровья» (Москва, 2016), XXIII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН (Москва, 2018), Школе-конференции молодых ученых с международным участием «Ильинские чтения» (Москва, 2018).

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

Личный вклад автора

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

Структура и объем диссертации

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

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Культура клеток

Эксперименты выполнены на культурах фибробластов, выделенных из биоптатов кожи из заушной области здоровых доноров (мужчины 35–50 лет). На проведение исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Ткани биоптатов подвергали ферментативной обработке коллагеназой II типа (“Sigma”, Австрия). Полученные суспензии одиночных фибробластов культивировали в течение 14 сут при 37°C, 5% CO₂ в стандартной культуральной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) (“StemCell Technology”, США) с добавлением 2 ммоль/л L-глутамина (“StemCell Technology”, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (“StemCell Technology”, США) и 20% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Biological Industries”, Израиль). В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0.05%-ным раствором трипсина и пассировали с плотностью 104 клетки/см² в той же культуральной среде, но с уменьшенным до 10% содержанием фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки пассировали, осуществляя замену питательной среды каждые 3 сут, до достижения культурой фибробластов 80–90% монослоя.

Фибробласты снимали с пластика раствором трипсина с 0.25% ЭДТА (“StemCell Technology”, США), отмывку клеток проводили в полной среде. Клетки пассировали в 35 мм чашки Петри на покровные стекла (“SPL Lifesciences”, Южная Корея). Для экспериментов использовали клетки на 3-м пассаже в фазе экспоненциального роста (плотность клеточной популяции ~ 60-70 %).

На 3-м пассаже перед проведением исследований, при достижении культурой клеток 80% монослоя, на проточном цитометре BD FACS Canto II (США) была проведена иммунофенотипическая характеристика клеток с помощью антител к поверхностным маркерам CD14, CD31, CD34, CD44, CD45, CD54, CD73, CD90,

CD105, HLA-DR. Установлено, что клетки имели высокий уровень экспрессии CD44, CD73, CD90, CD105, низкий уровень экспрессии молекулы адгезии (CD54) и антигена комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR) и не экспрессировали маркеры прогениторных, гемопоэтических (CD14, CD31, CD34, CD45) клеток. Полученный фенотип полностью соответствовал фенотипу дермальных фибробластов и не изменялся в процессе культивирования.

2.1.2. Облучение культуры фибробластов

Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 40 мГр/мин, напряжении 100 кВ, токе 0.8 мА, фильтре 1.5 мм Al, и температуре 4°C (для охлаждения использовались термогранулы “LAB ARMOR BEADS”). Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15%. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях CO₂ инкубатора (37°C, 5% CO₂) в течение 5-1440 мин.

2.1.3. Проведение иммуноцитохимического анализа

Клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (4% в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре, затем дважды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и пермеабилizировали 0.3% Тритон-Х100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7.4), содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания.

При проведении иммуноцитохимического окрашивания слайды инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами к белкам γ H2AX (разведение 1/200, клон EP854(2)Y, Merck-Millipore, США), pATM (разведение 1/200, Merck-Millipore, США), Rad51 (разведение 1/200, ABE257, Merck-Millipore, США), Ki67 (разведение 1/200; клон Ki-S5, Merck-Millipore, США), CENPF (разведение 1/200, ab5, Abcam, США) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Затем промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами, IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина.

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

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (“Nikon”, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (“Jenoptik AG”, Германия) с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340-380 нм возбуждение и 435-485 нм эмиссия) B-2E/C (465-495 нм возбуждение и 515-555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540-580 нм возбуждение и 600-660 нм эмиссия).

Анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов γ H2AX, Rad51 и фосфорилированного ATM (pATM) использовали программы Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>) и DARFI [Озеров И. В., 2015], а их солокализацию оценивали визуально.

Визуально также были определены клетки в различных фазах клеточного цикла (рисунок 1).

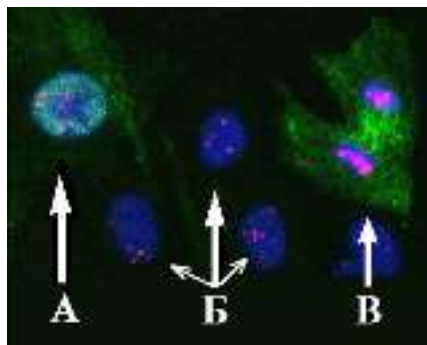


Рисунок 1. - Микрофотография клеток, окрашенных антителами к белку CENPF для определения фаз клеточного цикла и антителами к белку γ H2AX для определения ДР ДНК через 30 мин после воздействия рентгеновского излучения в дозе 80 мГр.

- А) клетка в S/G2 фазе (CENPF+ клетки)
- Б) клетки в G0/G1 фазе (CENPF- клетки)
- В) клетка в митозе

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

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

Для анализа вклада ГР были построены кривые, аппроксимирующие экспериментальные значения количества фокусов γ H2AX и Rad51. Для аппроксимации экспериментальных точек, на которых наблюдается уменьшение количества фокусов (для γ H2AX - начиная с 1 ч, для Rad51 - начиная с 6 ч) была использована экспоненциальная функция вида:

$$N = N_0 + A \cdot \exp^{-t/t_0}, \text{ где}$$

N – суммарное число фокусов,

N_0 - число фокусов в контроле,

A - амплитуда,

t - время,

t_0 - время, за которое число фокусов снижается в e раз или характерное время жизни фокусов

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

Характерные времена (t_0) определялись по графику для дозы 1000 мГр, где относительная ошибка была наименьшая. Значения этих времен составили для фокусов γ H2AX – 3,18 ч, а для фокусов Rad51 – 7,49 ч и использовались в дальнейших расчетах вклада гомологической рекомбинации для всех исследуемых доз.

Дополнительно, для расчета вклада гомологичной рекомбинации использовали метод трапеций [Демидович Б. П., 1966]. На основании отношения площадей под кривыми Rad51 и γ H2AX, деленного на отношение характерных времен жизни фокусов Rad51 и γ H2AX был сделан вывод о вкладе ГР в репарацию ДНК в течение 24 ч от момента облучения.

2.2. Результаты и обсуждение

2.2.1. Изменения количества фокусов γ H2AX в фибробластах человека после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр

На первом этапе работы была проведена оценка количества радиационно-индуцированных фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) от дозы рентгеновского излучения в различное время после воздействия. Установлена линейная зависимость между количеством фокусов γ H2AX и дозой облучения в диапазоне 20-1000 мГр через 0,5-8 ч после облучения (рисунок 2).

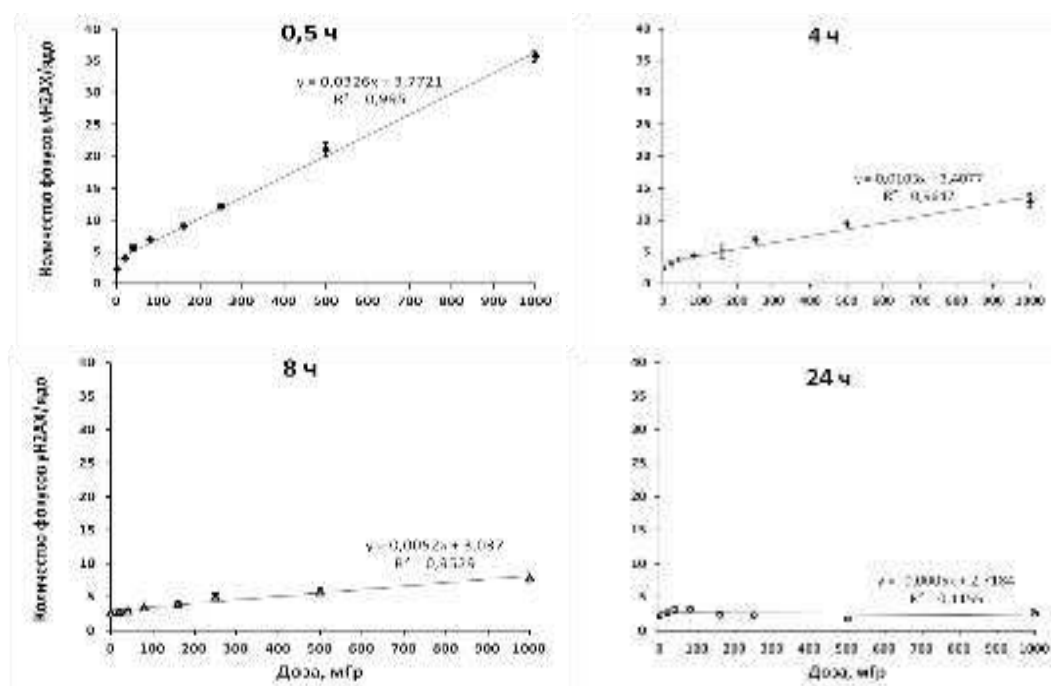


Рисунок 2.- Зависимость количества фокусов γ H2AX в фибробластах кожи человека от дозы облучения и времени после воздействия.

Максимальное фосфорилирование H2AX происходило через 0,5 ч после радиационного воздействия. По мере увеличения времени инкубации фибробластов после облучения наблюдалось снижение количества фокусов γ H2AX, что отражается графически уменьшением угла наклона прямой.

2.2.2. Пострадиационное восстановление структуры ДНК от двуниевых разрывов

2.2.2.1. Оценка изменения количества фокусов γ H2AX в фибробластах человека после облучения в дозах 20-1000 мГр

В клетках в ответ на образование ДР запускается процесс репарации ДНК. В настоящей главе представлены результаты оценки пострадиационных изменений количества фокусов γ H2AX (рисунок 3). Максимальное количество фокусов γ H2AX, установленное через 0,5 ч после радиационного воздействия в дозах 160-1000 мГр, снижалось по экспоненциальной зависимости в течение 24 ч до уровня в контроле. При этом четко выделялась первая, быстрая фаза убыли фокусов γ H2AX, которая заканчивалась через 4-6 ч. За это время происходило уменьшение количества фокусов на 50–70%. К концу второй, медленной фазы убыли фокусов γ H2AX, то есть через 24 ч, в клетках регистрировали от 7 до 27% фокусов от наибольшего количества, установленного через 30 мин после воздействия ИИ.

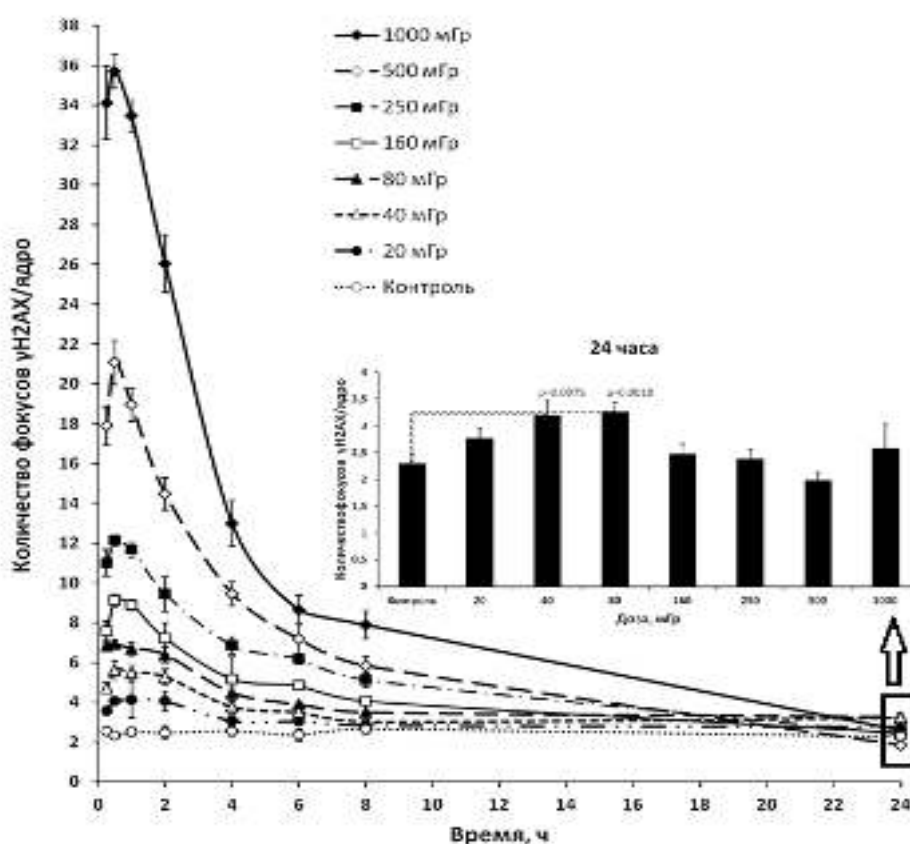


Рисунок 3.- Изменения количества фокусов γ H2AX в фибробластах кожи человека в первые 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр.

Максимальное количество фокусов γ H2AX после воздействия ИИ в малых дозах (20 - 80 мГр) наблюдалось через 0,5 ч после облучения и существенно не изменялось в течение 2 ч (рисунок 3). Фаза медленного снижения, начавшаяся через 4 ч после облучения, завершалась через 24 ч, когда остаток составлял 50 - 68% от максимального количества фокусов γ H2AX.

«Остаточные» фокусы γ H2AX представлены отдельно на гистограмме рисунка 3. Выявлено, что в клетках, облученных в дозах 40-80 мГр, количество «остаточных» фокусов γ H2AX было выше, чем в контроле и в клетках, облученных в средних дозах.

Таким образом, процесс деградации фокусов γ H2AX начинается через 30 мин после облучения фибробластов в средних дозах, проходя последовательно две фазы снижения: быструю и медленную. В клетках, облученных в малых дозах, деградация фокусов начинается позднее, через 2 ч, проходит также через две фазы: быструю и медленную, но не завершается через 24 ч. Что может объясняться либо задержкой восстановления ДНК от ДР, либо появлением новых фокусов γ H2AX.

2.2.2.2. Влияние дозы рентгеновского излучения и времени после облучения на изменения количества и размера фокусов фосфорилированного белка АТМ (pATM) и фокусов γ H2AX

На следующем этапе было проведено исследование совместного изменения количества фокусов γ H2AX и киназы АТМ. АТМ является одной из основных киназ, принимающих участие в фосфорилировании гистона H2AX и репарации ДНК от радиационно-индуцированных ДР. Изменения количества фокусов γ H2AX и pATM, а также их солокализации в ядрах фибробластов были исследованы в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр.

Подсчет фокусов pATM и их солокализация с фокусами γ H2AX показал, что в случае облучения в дозах 160-1000 мГр максимум pATM ($24,33 \pm 5,03$ фокус/клетка/Гр) устанавливается на 5-15-ой мин после облучения. В дальнейшем их количество постепенно уменьшается. Через 24 ч количество фокусов pATM, γ H2AX и их солокализация уменьшается до уровня контроля ($2,08 \pm 0,48$ фокус/клетка). После облучения в дозах 20, 40 и 80 мГр максимальное количество фокусов pATM регистрировалось через 2 ч. Через 24 ч после облучения фибробластов в малой дозе определялось большее процентное содержание «остаточных» фокусов pATM по сравнению с процентом оставшихся фокусов на этот срок после воздействия ИИ в дозе 1000 мГр (рисунок 4). Через сутки после облучения в дозах 250 и 1000 мГр процент фокусов pATM составил, соответственно, $33,90 \pm 5,08\%$ и $11,46 \pm 1,72\%$, а для малой дозы (80 мГр) - $42,09 \pm 6,31\%$ (рисунок 4Б). Для расчета процента «остаточных» фокусов pATM через 24 ч использовали соответствующий максимум фосфорилирования АТМ для каждой дозы.

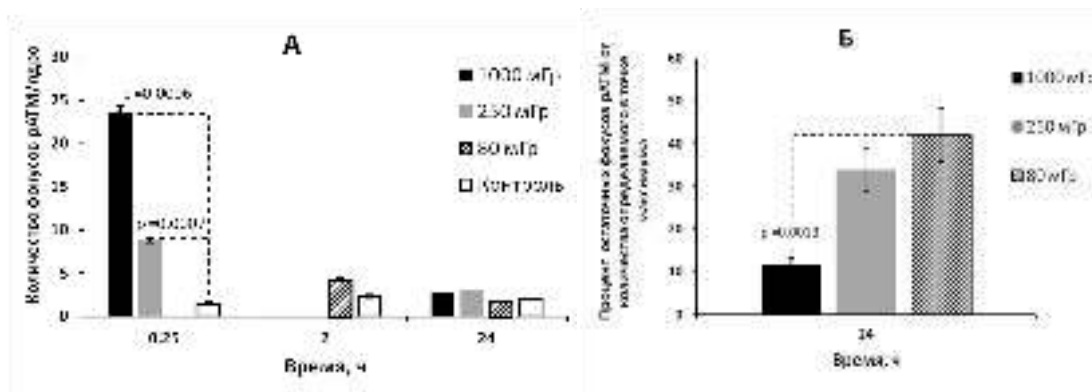


Рисунок 4.- Количество и процент «остаточных» фокусов рАТМ в фибробластах кожи человека после облучения в дозах 1000, 250 и 80 мГр.

А) Количество фокусов рАТМ через 0,25; 2 и 24 ч.

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

Важное значение имеют не только изменения количества фокусов белков репарации, но и меняющиеся размеры этих образований. Это убедительно прослеживается на результатах после облучения фибробластов в дозах от 20 до 1000 мГр и сопоставления двух сроков исследования 0,5 ч и 24 ч. Средние размеры фокусов γ H2AX и рАТМ через 0,5 ч после облучения клеток во всех использованных дозах (20-1000 мГр) различались не существенно и составляли для γ H2AX 41 пиксель и для рАТМ 23 пикселя (рисунок 5).

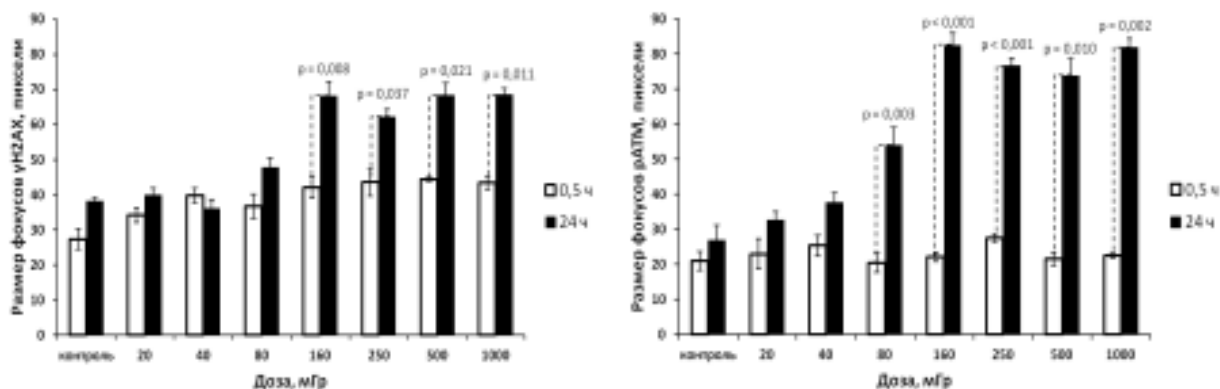


Рисунок 5.- Размер фокусов γ H2AX и рАТМ в ядрах фибробластов через 0,5 и 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-1000 мГр.

Через 24 ч в клетках, облученных в дозах 160-1000 мГр средние размеры фокусов γ H2AX и рАТМ увеличились соответственно в 1,5 и 3 раза. В то же время после облучения в дозах 20 и 40 мГр не было отмечено заметного увеличения размеров фокусов. При воздействии рентгеновского излучения в дозе 80 мГр через 24 ч также не регистрировалось увеличение размеров фокусов γ H2AX, но происходило

увеличение размеров фокусов pATM, хотя и менее выраженное по сравнению с действием доз среднего диапазона.

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют, во-первых, о том, что характер фосфорилирования гистона H2AX киназой ATM зависит от дозы облучения. Во-вторых, что киназа ATM участвует в длительном поддержании повышенного количества фокусов γ H2AX в фибробластах после их облучения в малой дозе. Это участие может быть связано с необходимым присутствием киназы ATM в репарации ДР по механизму гомологичной рекомбинации.

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

Определение ключевого белка гомологичной рекомбинации - Rad51 было проведено в течение 24 часов с момента облучения фибробластов в дозах 20-1000 мГр. Увеличение количества фокусов Rad51 наблюдалось через 2 ч, а через 6 ч достигало максимальных значений после воздействия ИИ во всех дозах. Снижение количества фокусов Rad51 до контрольного уровня ($1,32 \pm 0,12$ фокус/клетка) происходило через 24 ч (рисунок 6). Только в клетках, облученных в дозах 40 и 80 мГр, среднее количество «остаточных» фокусов Rad51 составило $1,76 \pm 0,11$ фокус/клетка, незначительно превысив показатели в клетках, облученных в средних дозах ($1,40 \pm 0,08$ фокус/клетка) и в контроле ($1,32 \pm 0,12$ фокус/клетка) (см. гистограмму рисунка 6).

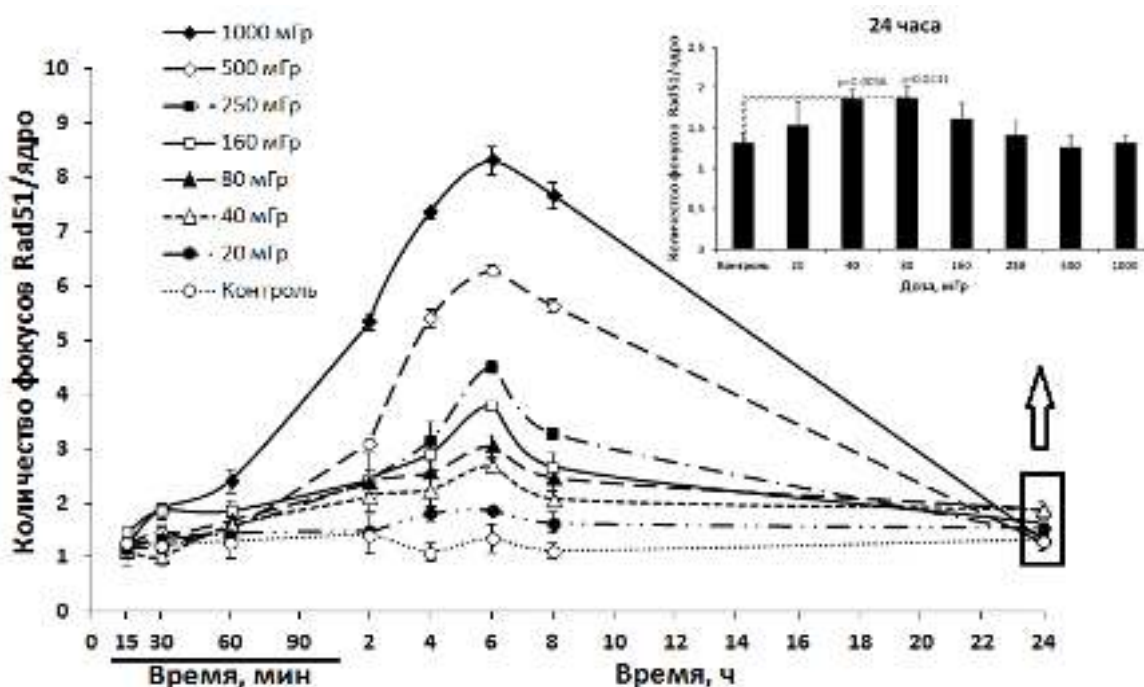


Рисунок 6. - Изменения количества фокусов Rad51 в фибробластах человека в течение 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20 - 1000 мГр.

Для оценки вклада ГР в репарацию ДР ДНК провели исследование количества фокусов γ H2AX совместно с Rad51. Рассчитав отношение числа единичных актов инициации фокусов Rad51 к числу таких же актов для фокусов γ H2AX, оценили вклад ГР в репарацию ДР ДНК в течение 24 ч от момента облучения. Процент фокусов γ H2AX, восстановленных по пути ГР, можно интерпретировать как «корректно» репарированные ДР ДНК.

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

В результате радиационного воздействия на клетки в дозе 1000 мГр вклад ГР в репарацию ДР ДНК в интервале 0,25-6 ч после облучения (быстрая фаза деградации фокусов γ H2AX) был минимален (рисунок 7). Солокализация фокусов γ H2AX с Rad51 после облучения 1000 мГр составила через 1ч и 24 ч соответственно 7% и 51%. Основываясь на этих результатах, можно сделать вывод, что для облученных в дозе 1000 мГр фибробластов основной вклад в репарацию ДР ДНК до 6 ч (время быстрой фазы репарации ДР ДНК) вносит НГСК. Через 6 ч после облучения практически все фокусы γ H2AX солокализированы с фокусами белка Rad51 (рисунок 7А). Во время медленной фазы репарации ДР ДНК (от 6 до 24 ч) активизируется ГР. Согласно расчетам вклад ГР составлял 9% (рисунок 7Б).

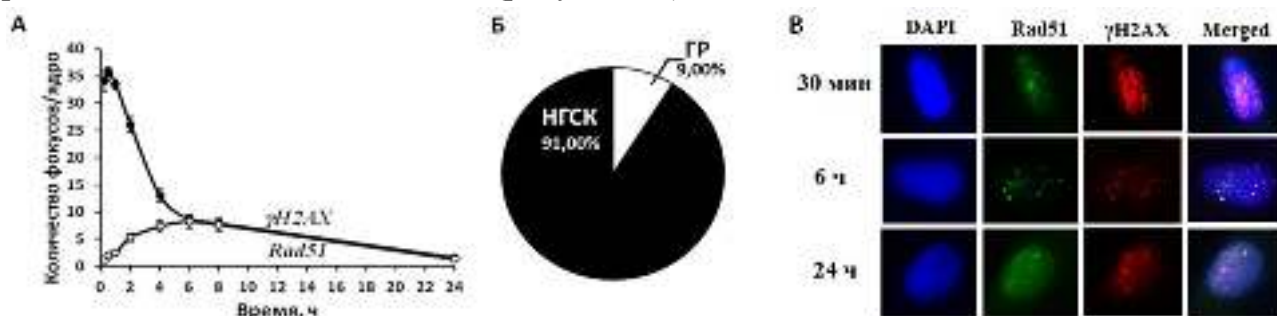


Рисунок 7. - Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после воздействия рентгеновского излучения в дозе 1000 мГр.

А. Изменения количества фокусов γ H2AX и Rad51.

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

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γ H2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева направо: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γ H2AX; наложенные микроизображения (merged).

При снижении дозы облучения до 250 мГр солокализация фокусов γ H2AX с Rad51 через 1 ч после воздействия была 13% и через 24 ч - 60% (рисунок 8А).

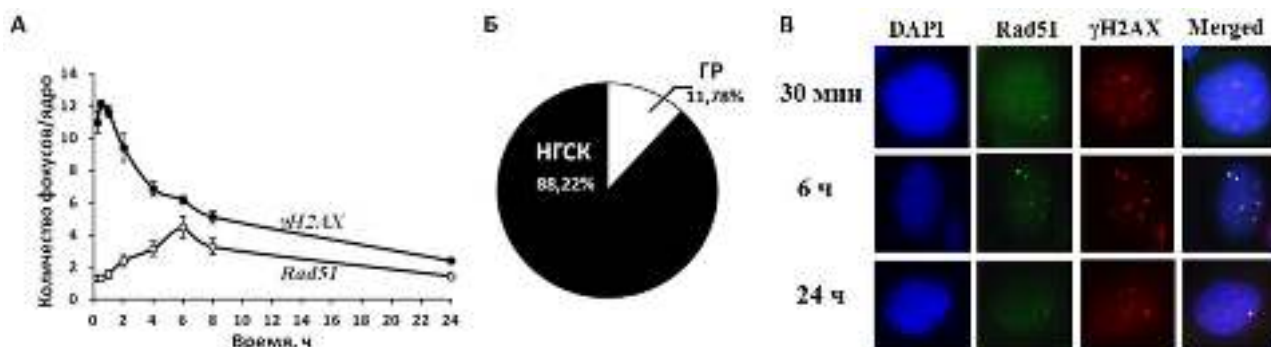


Рисунок 8. - Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после воздействия рентгеновского излучения в дозе 250 мГр.

А. Изменения количества фокусов γ H2AX и Rad51.

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

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γ H2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева направо: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γ H2AX; наложенные микроизображения (merged).

Соответственно, снижение дозы облучения клеток приводит к увеличению вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК. Согласно расчетам, после облучения клеток в дозе 250 мГр вклад гомологичной рекомбинации составлял приблизительно 12% (рисунок 8Б).

Дальнейшее исследование вклада ГР в репарацию ДР ДНК провели с использованием малой дозы - 80 мГр. Солокализация фокусов γ H2AX с Rad51 составила 25% через 1 ч после облучения и 58% через 24 ч (рисунок 9А). Доля ГР после облучения клеток в дозе 80 мГр, согласно расчетам, равнялась 16% (рисунок 9Б).

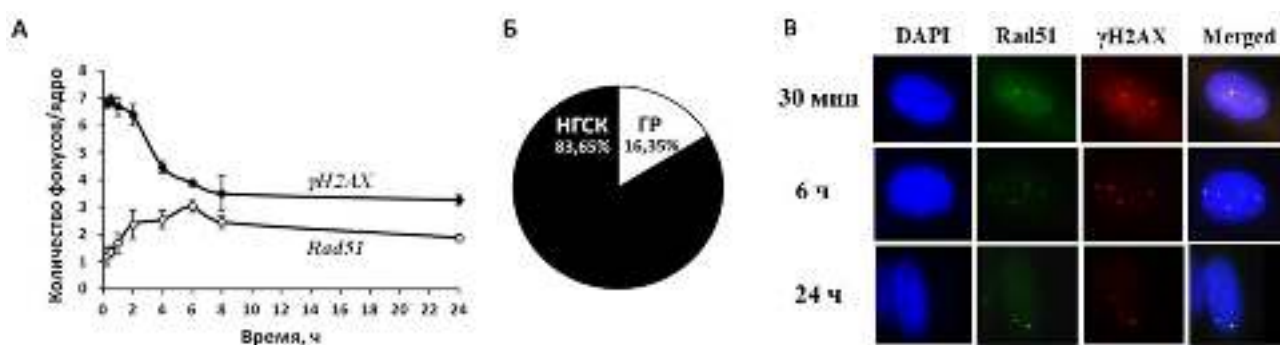


Рисунок 9. - Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК после воздействия рентгеновского излучения в дозе 80 мГр.

А. Изменения количества фокусов γ H2AX и Rad51.

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

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γ H2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева направо: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γ H2AX; наложенные микроизображения (merged).

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

Кроме того, в представленный расчет важно внести поправку на механизм репарации фоновых фокусов γ H2AX. Основываясь на результатах эксперимента с необлученными фибробластами по показателям количества фокусов фосфорилированных белков H2AX и Rad51, используя метод трапеций и поправочный коэффициент на время жизни фокусов, рассчитали также относительный вклад ГР в репарацию ДНК. В контрольной популяции фибробластов 22% ДР ДНК репарируются посредством ГР, а вторая часть (78%) по пути НГСК (рисунок 10Б).

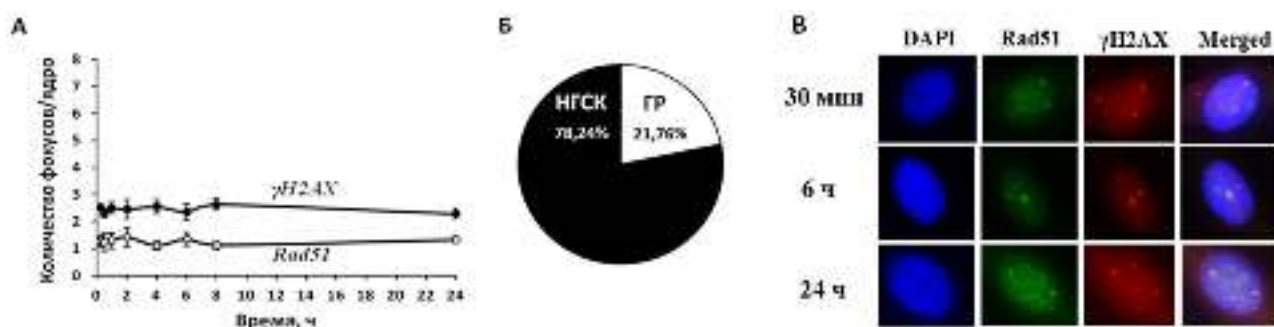


Рисунок 10.- Оценка вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК в необлученных фибробластах кожи человека.

А. Изменения количества фокусов γ H2AX и Rad51 в контрольной (необлученной) популяции.

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

В. Микрофотографии фокусов белков Rad51 и γ H2AX в ядрах фибробластов кожи человека. Слева направо: клеточное ядро, окрашенное DAPI; фокусы Rad51; фокусы γ H2AX; наложенные микроизображения (merged).

Следовательно, наибольший вклад ГР вносит в репарацию ДНК в необлученной популяции фибробластов.

После облучения клеток в дозах малого диапазона (20-80 мГр) относительный вклад ГР снижается с 22 до 16-18% (рисунок 11). Увеличение дозы облучения клеток до средних приводит к дальнейшему снижению вклада ГР в репарацию ДР ДНК. Так, после облучения фибробластов в дозе 1000 мГр вклад ГР составил 9%.

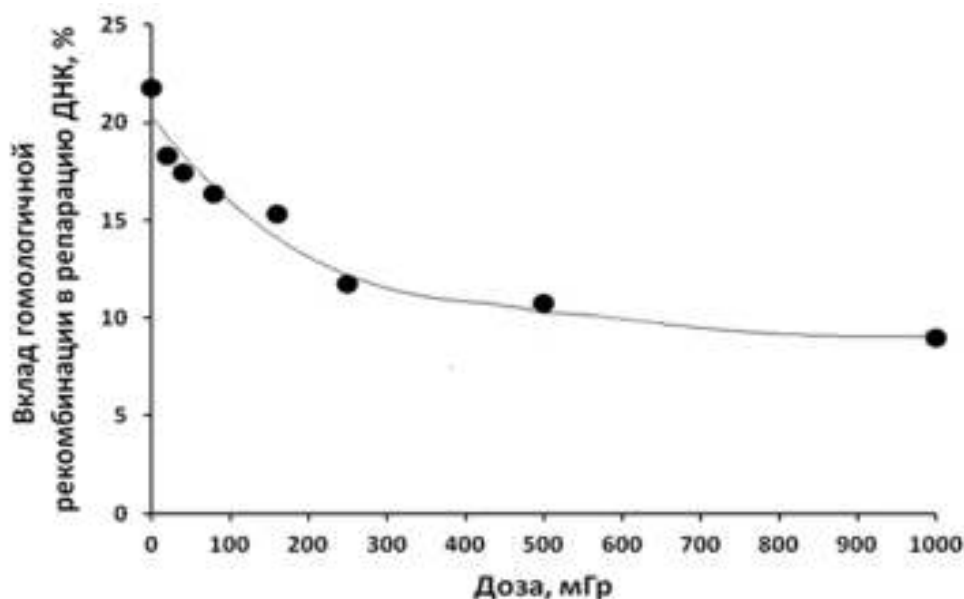


Рисунок 11. - Зависимость вклада гомологичной рекомбинации в репарацию ДР ДНК от дозы облучения, рассчитанная методом трапеций.

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

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

Для оценки универсальности и значимости фазы клеточного цикла во время лучевого воздействия предстояло оценить кинетику пострадиационных изменений количества фокусов γ H2AX на фоне изменений пролиферативной активности фибробластов кожи человека.

2.2.3.1. Влияние пролиферативной активности фибробластов на изменение количества радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX

Для исследования влияния пролиферативной активности клеток на количество фокусов γ H2AX после радиационного воздействия были применены три дозы облучения: 80, 250 и 1000 мГр, относящиеся к малому и среднему диапазонам.

В качестве маркера клеточной пролиферации использовали белок Ki67. На рисунке 12 отражены результаты изменения количества фокусов γ H2AX в несинхронизированных, пролиферирующих (Ki67+) и покоящихся (Ki67-) клетках в течение 24 ч с момента их облучения.

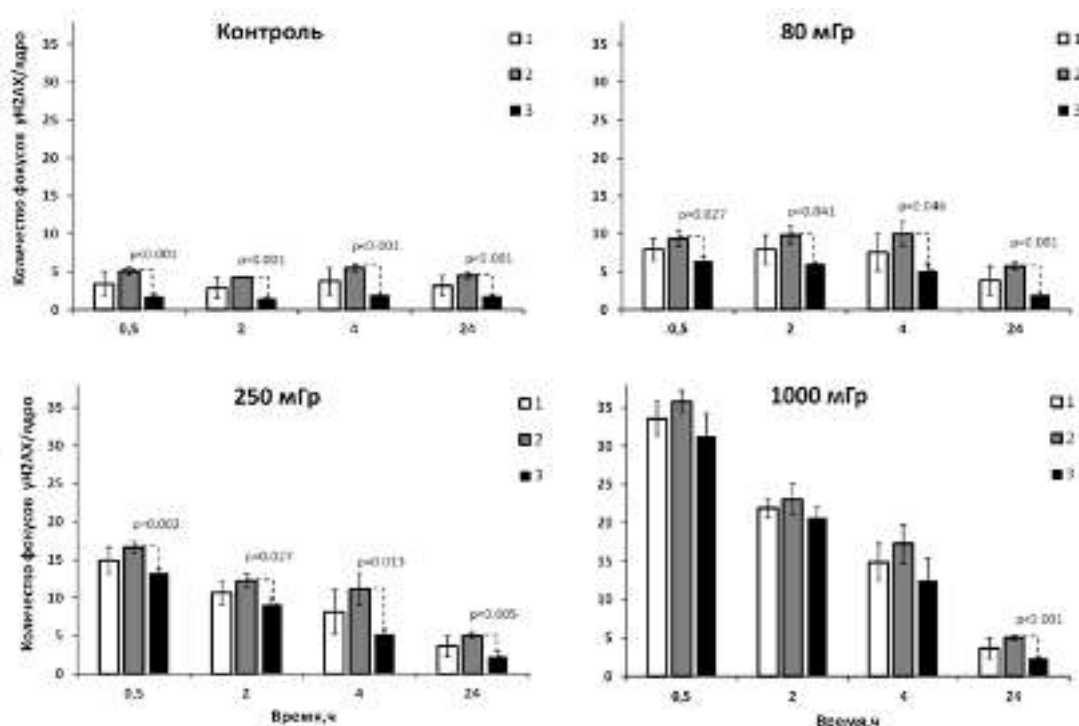


Рисунок 12.- Кинетика изменений количества фокусов γ H2AX в несинхронизированных (1), пролиферирующих (Ki67+) (2) и покоящихся (Ki67-) (3) фибробластах после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

Изменения количества фокусов γ H2AX в пролиферирующих (Ki67+) и покоящихся (Ki67-) фибробластах после их облучения в дозах 250 и 1000 мГр имели сходную динамику уменьшения, достигая контрольного уровня к 24 ч. При этом, количество «остаточных» радиационно-индуцированных фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках, статистически достоверно не отличалось от показателей в контроле.

Иная картина наблюдалась после облучения фибробластов в дозе 80 мГр. Количество фокусов γ H2AX как в пролиферирующих, так и в покоящихся клетках в течение 4 ч с момента облучения существенно не изменялось и составляло, соответственно, $9,75 \pm 1,54$ и $5,88 \pm 0,83$ фокус/клетка. Через 24 ч происходило снижение числа фокусов γ H2AX, при этом в пролиферирующих клетках их количество составило $5,73 \pm 0,30$, а в контроле $4,47 \pm 0,47$. В непролиферирующих клетках количество фокусов γ H2AX не отличалось от контрольных значений.

В контрольных (необлученных) фибробластах фоновое количество фокусов γ H2AX в пролиферирующих клетках было выше в 2,7 раза ($p < 0.001$), чем в покоящихся ($4,75 \pm 0,47$ и $1,75 \pm 0,10$, соответственно). После облучения в дозе 1000 мГр статистически достоверные различия между количеством фокусов в пролиферирующих и покоящихся клетках регистрировали через 24 ч. При применении доз 80 и 250 мГр количество фокусов γ H2AX в пролиферирующих клетках было выше, чем в покоящихся независимо от времени после их облучения.

На следующем этапе исследований был проведен дифференциальный анализ количества фокусов γ H2AX в клетках S/G2 и G0/G1 фазах клеточного цикла с

использованием белка CENPF, ассоциированного с центромерно-кинетохорным комплексом (рисунок 13).

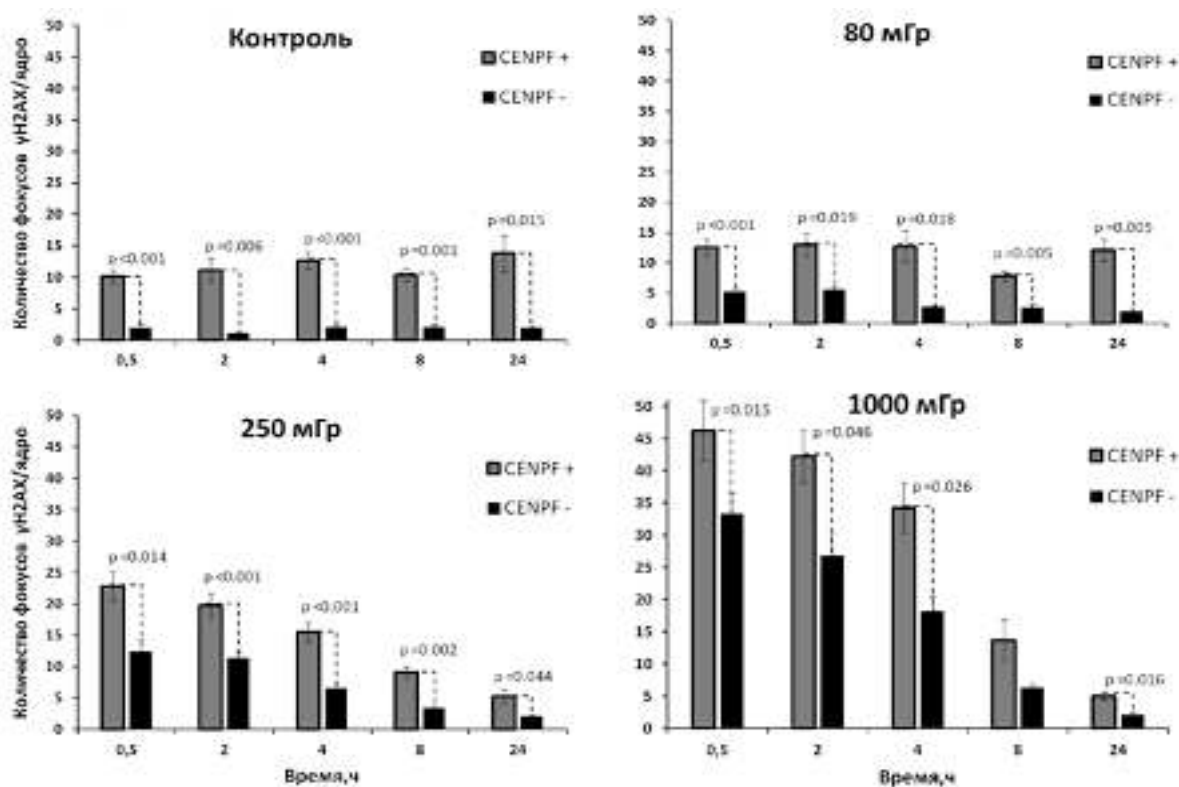


Рисунок 13.- Кинетика изменений количества фокусов γ H2AX в CENPF позитивных и CENPF негативных фибробластах в течение 24 ч после облучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

В результате исследования было обнаружено, что как в необлученном контроле, так и после облучения фибробластов количество фокусов γ H2AX в CENPF+ клетках было выше, чем в CENPF- . В контрольных (необлученных) CENPF+ клетках количество фокусов γ H2AX приблизительно в 6,4 раза ($p < 0,001$) превышало число фокусов γ H2AX в CENPF- клетках ($11,59 \pm 0,71$ и $1,80 \pm 0,18$, соответственно). В облученных фибробластах количество фокусов γ H2AX в CENPF позитивных клетках было выше во все сроки исследования, чем в CENPF негативных клетках в 1,9 раза, 2,2 раза и 3,7 раза соответственно для доз 1000 мГр, 250 мГр и 80 мГр.

Кинетика изменения количества фокусов γ H2AX в CENPF+ контрольных и облученных фибробластах в дозе 80 мГр была аналогичной. Количество фокусов γ H2AX определялось примерно на одном уровне в течение 24 ч с момента облучения и составило около 12 фокус/клетка, что превышало количество фокусов γ H2AX после облучения фибробластов средними дозами в 2,3 раза ($5,27 \pm 1,07$, $p = 0,032$).

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

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

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

Было показано, что облучение в малых дозах стимулирует клеточную пролиферацию и увеличивает долю CENPF+ клеток приблизительно на 25 %, а облучение в средних дозах вызывает их снижение (рисунок 14).

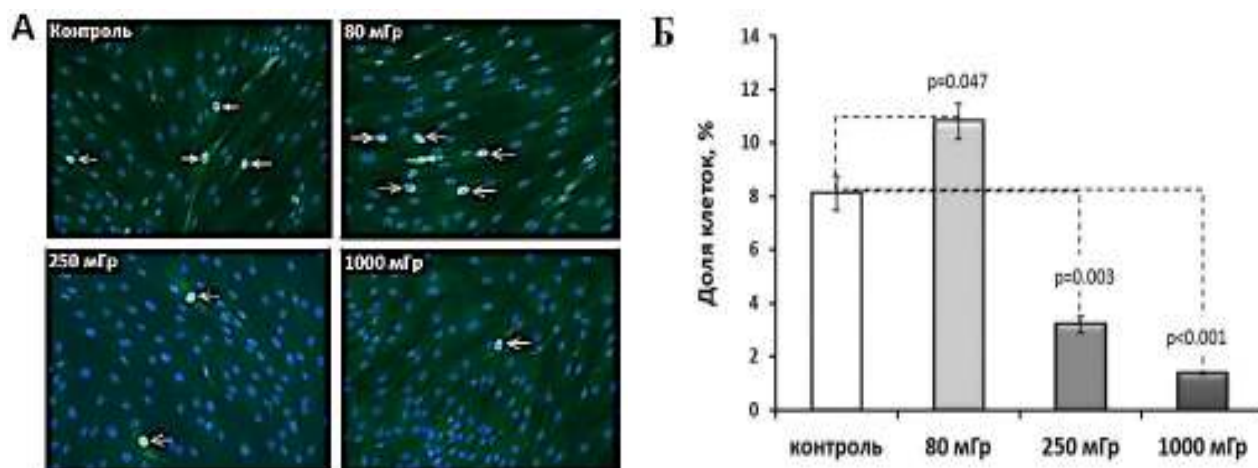


Рисунок 14.- Анализ CENPF позитивных клеток через 24 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 80, 250 и 1000 мГр.

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

Б. Доля (%) CENPF позитивных клеток.

Итак, увеличение доли CENPF+ клеток после облучения фибробластов в дозе 80 мГр вполне объясняет феномен длительного поддержания повышенного количества фокусов γ H2AX после облучения клеток в дозах 20-80 мГр, выявленное нами ранее.

Следует отметить, что нередко исследования выполняется на несинхронизированных культурах, не учитывая различий в количестве фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках. Как следствие, это отражается на подсчете среднего количества фокусов γ H2AX в асинхронных клеточных популяциях, увеличивая их количество в клетках, облученных в малых дозах и занижая в клетках, облученных в средних дозах. Этот результат особенно важен, поскольку анализ γ H2AX в качестве биологического маркера ДР ДНК нашел широкое применение в различных биологических исследованиях, например, в радиационной биодозиметрии, оценке индивидуальной радиочувствительности, тестировании лекарственных и химиотерапевтических препаратов и т.д.

Таким образом, проведенное исследование дает основание заключить, что необходимо проводить детальный анализ изменения количества фокусов γ H2AX с учетом пролиферативной активности, фаз клеточного цикла и оценкой изменений распределения клеточной популяции по стадиям клеточного цикла. В тоже время,

влияние пролиферативной активности фибробластов на изменения количества РИФ γ H2AX является, по-видимому, дополнительным фактором, а определяющим остается доза лучевого воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

- а. Радиационно-индуцированные двунитевые разрывы ДНК
- б. Пострадиационное восстановление структуры ДНК от ДР
- в. «Остаточные» фокусы – последствия пострадиационного восстановления

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

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

После облучения фибробластов в средних дозах деградация фокусов γ H2AX начиналась через 30 мин и прекращалась в течение первых суток. В клетках, облученных в малых дозах, деградация фокусов γ H2AX начиналась позднее, через 2 ч и не завершалась к окончанию первых суток.

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

Количество фокусов основного белка гомологичной рекомбинации Rad51 в нормальных фибробластах человека изменялось после рентгеновского облучения как в малых, так и в средних дозах синхронно: достоверное увеличение количества фокусов регистрировалось через 2 ч после воздействия, а максимальные количества определяли через 6 ч. Количества возникающих фокусов Rad51 были пропорциональны дозам излучения.

Анализ количества фокусов Rad51 позволил выявить, что именно гомологичная рекомбинация вызывает повышенный уровень фокусов γ H2AX и pATM через 24 ч после облучения клеток. Полученные данные свидетельствуют о более «корректной» репарации «остаточных» повреждений ДНК, которые были вызваны малыми дозами ИИ.

в. Количество фокусов γ H2AX существенно уменьшалось через 24 ч после лучевого воздействия и в зависимости от дозы облучения (1000, 250 и 80 мГр) составляло по отношению к максимальным значениям, зафиксированным через 0,5 ч, соответственно: 7%, 20% и 47%. Аналогичные количественные изменения через 24 ч после облучения в средних и малых дозах претерпевали и фокусы pATM и Rad51. Их процентное содержание по отношению к указанным выше дозам рентгеновского излучения составило соответственно: 11%, 34% и 42% для pATM и 16%, 32% и 62% для Rad51. В результате, в фибробластах через 24 ч после воздействия малых доз регистрировали более высокое процентное содержание фокусов белков репарации ДНК по сравнению с показателями для доз среднего диапазона. Длительное поддержание повышенного количества фокусов γ H2AX после облучения в малой дозе может быть связано только с пролиферативной активностью клеток. В пролиферирующих клетках осуществляется эффективная система репарации. Контролируемая дифференцировка клеточного цикла подтверждает, что облучение фибробластов на стадии S/G2 в малой дозе (80 мГр) не только не вызывает ареста клеточного цикла, но способствует стимуляции пролиферации, что подтверждается прохождением клеток по циклу.

Выявленная закономерность обосновывает необходимость для избежания погрешностей в интерпретации результатов количества фокусов γ H2AX проводить их анализ с учетом пролиферативной активности клеток и фаз клеточного цикла.

Основное значение настоящей работы состоит в доказательстве на модели изолированных клеток отсутствия признаков отрицательного воздействия редко ионизирующего излучения в малых дозах (по классификации *UNSCEAR, 2012*) на фибробласты кожи человека.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. **Грехова, А. К.** Замедленные процессы образования и деградации фокусов γ H2AX в фибробластах кожи человека, облученных рентгеновским излучением в малых дозах/ **А. К. Грехова**, П. С. Еремин, А. Н. Осипов, И.И. Еремин, М. В. Пустовалова, И. В. Озеров, Н. М. Сметанина, Н. Л. Лазарева, Н. Ю. Воробьева, А. А. Пулин, О. А. Максимова, А. В. Гордеев, А. Ю. Бушманов, К.В. Котенко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 395-401.
2. Osipov, A. N. Activation of homologous recombination DNA repair in human skin fibroblasts continuously exposed to X-ray radiation/ A.N. Osipov, **A.Grekhova**, M. Pustovalova, I. V. Ozerov, P. Eremin, N. Vorobyeva, N.Lazareva, A. Pulin, A. Zhavoronkov, S. Roumiantsev, D. Klokov, I. Eremin // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 29. – P. 26876-26885.
3. **Грехова, А. К.** Проблема анализа пострadiационных изменений количества фокусов γ H2AX в асинхронной клеточной популяции/ **А. К. Грехова**, М. В. Пустовалова, П. С. Еремин, Е.И. Яшкина, А. Н. Осипов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т.58 , №5. – С. 484-489.
4. **Грехова, А. К.** Оценка вклада гомологической рекомбинации в репарацию двунитевых разрывов ДНК в фибробластах человека после воздействия рентгеновского излучения в малой и средних дозах/ **А. К. Грехова**, М. В. Пустовалова, П. С. Еремин, И. В. Озеров, О. А. Максимова, А. В. Гордеев, Н. Ю. Воробьева, А. Н. Осипов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т.58, №6. – С. 590-597.

Тезисы конференций:

1. Osipov, A. Activation of cellular defense mechanisms reducing the DNA double-strand amount and reactive oxygen species production in primary human dermal fibroblasts under continuous low dose-rate X-ray radiation exposure/ A. Osipov, I. Eremin, **A. Grekhova**, P. Eremin, I. Ozerov, M. Pustovalova, N. Smetanina, N. Vorobyeva, N. Lazareva, A. Pulin, O. Maksimova, A. Bushmanov, K. Kotenko// Book of Abstracts: The Third International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, RAD 2015 (June 08-12, 2015, Budva, Montenegro). RAD Association. Niš. Serbia. 2015. P. 428.
2. Пустовалова, М.В. Количественные и качественные изменения фокусов белков репарации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, облученных рентгеновским излучением/ М.В. Пустовалова, И.В. Озеров, Н.М. Сметанина, **А.К. Грехова**, Н.Ю. Воробьева, С.Г. Андреев, А.Н. Осипов// Научная сессия НИЯУ МИФИ-2015, аннотации докладов, Т.2. Москва. 2015. С. 77.
3. Пустовалова, М.В. Особенности репарации двунитевых разрывов ДНК в фибробластах кожи человека, облученных рентгеновским излучением в малых дозах/ М.В. Пустовалова, **А.К. Грехова**, Н.М. Сметанина, П.С. Еремин, И.В.

- Озеров, И.И. Еремин, А.Н. Осипов// Сборник трудов XX ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. Москва. 2015. С.102-105.
4. **Grekhova, Anna K.** Comparative studies of γ H2AX foci number changes in human skin fibroblasts exposed to X-ray radiation at low vs intermediate doses/**Anna K. Grekhova**, Margarita V. Pustovalova, Andreyan N. Osipov// 42nd Conference of the European Radiation Research Society (4-8 September 2016). Amsterdam. 2016. P. 47.
 5. **Грехова, А.К.** Сравнительное исследование закономерностей изменения количества фокусов γ H2AX в фибробластах кожи человека после воздействия рентгеновского излучения в диапазоне малых и умеренно-низких доз/ **А.К. Грехова**, М.В. Пустовалова, И.В. Озеров, Н.Ю. Воробьева, А.Н.Осипов// Сборник тезисов Международного научно-практического форума «Ядерные технологии на страже здоровья» (1-3 ноября 2016). Москва. 2016. С.54-55.
 6. **Грехова, А.К.** Влияние клеточного цикла на образование постлучевых двунитевых разрывов ДНК / **А.К. Грехова**, М.В. Пустовалова, А.Н. Осипов// Сборник трудов XXIII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. (28 февраля 2018 года). Москва. С.14-15.
 7. **Грехова, А.К.** Исследование закономерностей изменения количества фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся фибробластах кожи человека после действия рентгеновского излучения в дозах 0-1000 мГр/ **А.К. Грехова**, М.В. Пустовалова, А.Н. Осипов// Сборник трудов школы-конференции молодых ученых с международным участием «Ильинские чтения» (22 марта 2018 года). Москва. С.104.