DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-4-5-11

А.К. Чигасова[1, 2, 3], А.Н. Осипов[1, 2]

АНАЛИЗ ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В РАДИОБИОЛОГИИ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва
[2] Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва
[3] Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

Контактное лицо: Андреян Николаевич Осипов, e-mail: andreyan.osipov@gmail.com

СОДЕРЖАНИЕ

Введение
Общая характеристика гистона H2AX
Природа спонтанных (фоновых) фокусов γH2AX
Образование фокусов γH2AX в облученных клетках
Влияние структуры хроматина на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX
Влияние фазы клеточного цикла на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX
Остаточные радиационно-индуцированные фокусы γH2AX
Заключение

Ключевые слова: *γH2AX, повреждения ДНК, репарация ДНК, ионизирующие излучение*

Для цитирования: Чигасова А.К., Осипов А.Н. Анализ фокусов фосфорилированного гистона H2AX в радиобиологии: обзор литературы // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2026. Т. 71. № 4. С. 5–11. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-4-5-11

DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-4-5-11

A.K. Chigasova[1, 2, 3], A.N. Osipov[1, 2]

Analysis of Phosphorylated Histone H2AX Foci in Radiobiology: a Literature Review

[1] A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia
[2] N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia
[3] N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow, Russia

Contact person: A.N. Osipov, e-mail: andreyan.osipov@gmail.com

CONTENTS

Introduction
General characteristics of histone H2AX
Sources of spontaneous (background) γH2AX foci
Formation of γH2AX foci in irradiated cells
The influence of chromatin structure on the formation and degradation of radiation-induced γH2AX foci
The influence of cell cycle phase on the formation and degradation of radiation-induced γH2AX foci
Residual radiation-induced γH2AX foci
Conclusion

Keywords: *γH2AX, DNA damage, DNA repair, ionizing radiation*

For citation: Chigasova AK, Osipov AN. Analysis of Phosphorylated Histone H2AX Foci in Radiobiology: a Literature Review. Medical Radiology and Radiation Safety. 2026;71(4):5–11. DOI:10.33266/1024-6177-2026-71-4-5-11

Введение

В 1953 г. в журнале «Nature» опубликовано фундаментальное открытие Ф. Крика и Д. Уотсона о структуре дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), являющейся носителем наследственного кода клетки. Стало известно, что ДНК состоит из двух равнозначных цепей. Такая структура обеспечивает резерв надежности, так как в случае поломки (разрыва одной из цепей) вторая используется как матрица для восстановления целостности с соблюдением точной последовательности азотистых оснований. Несопоставимо сложнее развиваются процессы репарации в случае разрыва обеих цепей ДНК, которые могут возникать в результате воздействия различных эндогенных и экзогенных факторов (радиационное воздействие, химические соединения и др.). На пути изучения этих процессов основной методической трудностью становится поиск надежного метода определения двунитевых разрывов (ДР) ДНК. С 1973 г. были

предложены различные способы определения ДР ДНК, основанные на изменении физико-химических характеристик ДНК: метод гель-фильтрации [1], метод седиментации или ультрацентрифугирование в нейтральном градиенте сахарозы [2], метод пульс гель электрофореза [3], метод электрофореза ДНК единичных клеток (ДНК-комет) [4]. Однако чувствительность этих методов крайне низка (в зависимости от метода от нескольких Гр и даже десятков Гр) [5]. Для решения этой проблемы начиная с 1998 г. активно развиваются технологии непрямого анализа ДР ДНК, основанные на иммуноцитохимическом анализе количества динамических микроструктур, образующихся в местах репарации ДР ДНК и состоящих из белков, участвующих в репарации этих повреждений [5]. Эти микроструктуры получили название фокусы (англ. foci). Наибольшее развитие получил иммуноцитохимический анализ фокусов фосфорилированного корового гистона H2AX (γH2AX). Количественный анализ фокусов γH2AX в настоящее время считается самым чувствительным методом анализа репарации ДР ДНК и позволяет детектировать увеличение количества сайтов репарации ДР ДНК при дозах облучения всего в несколько мЗв [6].

Общая характеристика гистона H2AX

В 1998 г. было опубликовано сообщение Rogakou E.P. et al о том, что в клетках в первую минуту после воздействия рентгеновского излучения на месте образования ДР появляются фосфорилированные формы корового гистона H2AX [7].

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

Как и многие клеточные белки, гистон H2AX подвергается ряду химических реакций. Он может быть ацетилирован по лизину-5 [8, 9]; биотинилирован по лизину-9 и -13 [10]; убиквитилирован по лизину-119 [9] и фосфорилирован по серину-1[8] и -139 [7], а также по тирозину-142 [11].

При этом отмечено, что лишь некоторые реакции имеют значение при образовании ДР ДНК [12]. К примеру, в обычных условиях (без воздействия повреждающих факторов) фосфорилирование H2AX происходит по тирозину-142, а при появлении ДР ДНК моментально запускается его дефосфорилирование, которое в свою очередь, является предпосылкой для фосфорилирования H2AX по серину-139. Когда происходит фосфорилирование H2AX по тирозину-142, сродство серина-139 к факторам ответа на повреждение ДНК (MDC1, MRE11 и Rad50) значительно снижается и происходит связывание с проапоптотическим фактором JNK1. В этой связи было высказано предположение, что статус фосфорилирования по тирозину-142 является определяющим фактором судьбы клетки после повреждения ДНК [11].

Кроме того, убиквитилирование H2AX по лизину-119 с его предшествующим ацетилированием по лизину-5 способствуют высвобождению H2AX из хроматина под действием комплекса Tip60 и UBC13 после образования ДР ДНК, вызванных ионизирующим излучением, в результате чего, изменяется структура хроматина, и ДР становятся более доступными для белков репарации [9].

Центральным звеном многочисленных сигнальных путей, активируемых в ответ на ДР ДНК, является фосфорилирование гистона H2AX по серину-139. Присоединение фосфата происходит к кислороду серина в гамма-положении, поэтому модифицированная форма широко упоминается как γH2AX. Обнаружено, что γH2AX концентрируется в течение 20 с с момента образования ДР ДНК на расстояние до 2 Мб от места повреждения [7] и после иммуноцитохимического окрашивания проявляется в виде ярких точек, вследствие чего они получили название фокусов белков репарации. В настоящее время признано, что каждый фокус γH2AX представляет собой сайт репарации одиночных или множественных ДР ДНК [13] в результате которого фосфорилируется около 2000 молекул H2AX [14].

Природа спонтанных (фоновых) фокусов γH2AX

В клетках всегда присутствует фоновый уровень фокусов фосфорилированного гистона H2AX. Для каждого вида и линии клеток уровень спонтанных фокусов γH2AX является в определенной мере стационарной характеристикой [15, 16]. Так, уровень спонтанных фокусов γH2AX в ядрах фибробластов человека меняется в пределах от 0,2 до 2,6 фокусов/ядро [17]. Поскольку фокус γH2AX маркирует ДР ДНК, то объяснением существенного различия (в 5–50 раз) в количестве фоновых фокусов γH2AX можно считать коллапс репликативной вилки в S-фазе клеточного цикла. Еще одной причиной возрастания числа фокусов γH2AX могут быть повреждения ДНК на концевых участках хромосом или теломерах в процессе старения клеток [18]. Так, в результате многих циклов деления, когда клетка проходит через S-фазу, теломерная ДНК становится короче на 100–150 нуклеотидов, поскольку во время репликации ДНК невозможно точное копирование са́мых концов теломерной ДНК и, в результате, остаются очень короткие теломеры, которые не могут эффективно защищать концы хромосомальной ДНК. Так, Herbig U. et al (2006) было показано, что более 80% стареющих фибробластов бабуина имели фокусы γH2AX, индуцированные дисфункцией теломер [19]. Кроме того, для каждой линии клеток, характерно определенное количество повреждений ДНК, ассоциированных с теломерами [20].

Важно отметить, что значение фонового уровня фокусов γH2AX не зависит от доли белка H2AX в пуле гистона H2A, включающего все его варианты (H2A1, H2A2, H2A-Bbd, H2AX и H2AZ), в составе нуклеосом. По данным Rogakou E.P. et al (1998) в нормальных фибробластах человека около 10% H2AX присутствует в пуле гистона H2A, 2% H2AX от общего количества H2A в лимфоцитах и HeLa клетках и до 25% в опухолевой клеточной линии глиомы человека (SF268) [7]. В то же время в работе Markova E. et al (2007) было установлено, что в опухолевых клетках линии HeLa количество спонтанных фокусов γH2AX и значительно выше, чем в нормальных клетках (фибробласты линии VH-10) [21].

Наибольшее влияние на фоновый уровень фокусов γH2AX в клеточной популяции, по данным MacPhail S.H. et al (2003), оказывает распределение клеток по клеточному циклу [15]. Costes S. et al (2006) подтвердили этот феномен на фибробластах человека линии HCA-2 и показали, что около 11% ядер необлученных (контрольных) клеток содержат спонтанные фокусы γH2AX, причем из них доля пролиферирующих клеток составляла 9,2%, а непролиферирующих – 1,5%. Кроме того, были выявлены качественные (по размерам) и количественные различия в образовании спонтанных фокусов γH2AX. Пролиферирующие клетки содержали мелкие фокусы γH2AX и их количество колебалось в пределах от 1 до 69 в ядре. В непролиферирующих клетках наблюдались крупные фокусы γH2AX и их количество было весьма незначительно – от 1 до 4 в ядре [22]. Годом ранее на большом количестве клеточных линий McManus K. и Hendzel M. (2005) установили, что крупные фокусы фосфорилированного белка H2AX прояв-

ляют существенную солокализацию с репарационными белками, в то время как, солокализация между мелкими фокусами γH2AX и белками репарации практически отсутствовала [23]. Выявленная McManus K. и Hendzel M. (2005) закономерность хорошо согласовывалась с ранее опубликованной работой Rogakou E.P. et al (1999) в том, что мелкие фокусы γH2AX присущи митотическим клеткам из-за большего уплотнения в них хроматина, препятствующего транспорту ферментов к репарируемым структурам-мишеням в ДНК [14].

Образование фокусов γH2AX в облученных клетках

Повреждения ДНК, появившиеся в результате воздействия ионизирующего излучения на клетки, вызывают образование микроскопически видимых агрегатов ядерных белков, то есть радиационно-индуцированных фокусов (РИФ). Эти фокусы представляют собой скопления белков, которые образуются в области ДР ДНК после воздействия ионизирующего излучения. Rogakou E.P. et al (1998) удалось зарегистрировать индукцию γH2AX даже через 20 с после γ-облучения клеток яичников китайского хомячка (линии CHO) [7]. Причем половина от максимальных значений достигалась за первую минуту, а максимум регистрировали к 10-ой мин. Этот максимум РИФ γH2AX сохранялся 30 мин, а затем в течение нескольких часов происходило уменьшение количества γH2AX до контрольных значений [7]. Близкие результаты получены Rogakou E. P et al (1999) на нормальных фибробластах кожи индийского мунтжака (Muntiacus muntjak) [14]. Через 1 мин после воздействия γ- излучения в дозе 600 мГр появлялись мелкие фокусы γH2AX. Через 9 мин после облучения они становились более яркими и крупными, и достигали максимальной яркости и размера через 30 мин после облучения [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что в начале фосфорилируются молекулы H2AX вблизи участка ДР ДНК, а позднее включаются молекулы на более удаленных расстояниях от места повреждения ДНК. В работе Lobrich M. et al (2010) было отмечено, что максимальное число фокусов γH2AX формируется через 3 мин после воздействия ИИ, но подсчет затруднен в это время из-за их малых размеров [6].

Costes S.V. et al (2006) установили, что размеры и количество радиационно-индуцированных фокусов различаются в зависимости от дозы и продолжительности облучения, а также исследуемого белка. После облучения фибробластов человека линии HCA2 в дозе, равной или превышающей 300 мГр, не удалось обнаружить изменений в размере РИФ в течение 2 ч. Резкое увеличение размера РИФ по сравнению с контролем регистрировалось после снижения дозы до 100 мГр [22].

В связи с этим возникает вопрос о форме зависимости количества РИФ γH2AX от дозы облучения. В настоящее время принято считать линейной зависимость количества фокусов γH2AX от дозы ИИ. В 2003 г. Rothkamm K. и Lobrich M., пользуясь иммуноцитохимическим методом, установили линейную зависимость числа фокусов γH2AX при дозах облучения от 1 до 2000 мГр [13]. Прямую зависимость количества фокусов γH2AX от дозы облучения в диапазоне 10–3000 мГр обнаружили Costes S.V. et al [22], а позднее Asaithamby A. и Chen D. J. (2009) подтвердили для диапазона 5–1000 мГр [24]. В 2006 году Mahrhofer H. et al также отметили линейную закономерность количества фокусов γH2AX от дозы облучения на 10 нормальных и опухолевых клеточных линиях, применив большие дозы (1000–4000 мГр) [25]. Прямая зависимость количества фокусов от дозы ИИ в диапазоне 10-5000 мГр была установлена также для двух белков маркеров ДР ДНК (γH2AX и 53BP1) в исследовании Markova E. et al (2007) [21].

Вместе с тем появились исследования, в которых не подтверждается линейная зависимость между дозой облучения и образованием РИФ γH2AX. Авторы описывают формирование плато по ходу зависимости доза–эффект и объясняют его проявлением баланса между одновременно происходящими в клетках процессами индукции и репарации ДР ДНК [26, 27]. Аналогично, в исследовании зависимости доза–эффект с другим маркером ДР ДНК – белком 53BP1 – было показано, что количество радиационно-индуцированных фокусов не пропорционально дозе облучения [28]. Так, выход фокусов при облучении в дозах 100 мГр и 1000 мГр составил 73 фокус/клетка/Гр и 28 фокус/клетка/Гр соответственно. Повышенный уровень фокусов белка 53BP1 при облучении в малых дозах может быть обусловлен тем, что при небольшом количестве ДР даже незначительный вклад дополнительных ДР образующихся, например, при коллапсе репликативных вилок оксидативными повреждениями ДНК [29], является значимым для расчета относительного выхода фокусов.

Установлено, что процесс репарации ДР ДНК начинается с реакции фосфорилирования гистона H2AX, роль которого заключается в привлечении белков репарации к месту разрыва ДНК, и зависит от активности киназ семейства фосфатидилинозитол-3-киназ, а именно, ataxia telangiectasia mutated (ATM) (продукт гена, связанного с наследственным синдромом атаксии-телеангиэктазии), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) (ATM- и Rad3-родственная киназа), а также ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПК) [30].

Существует несколько представлений об участии киназ в репарации ДР ДНК. В 2000 году в работе Paull T.T. et al, выполненной на клетках, подвергнутых рентгеновскому облучению, была показана прямая зависимость между низким уровнем ATM и существенным снижением выхода фокусов γH2AX [31]. Через год результаты, полученные в исследованиях Burma S. et al (2001), позволили однозначно определить ATM как основную киназу, участвующую в фосфорилировании H2AX. Авторы предположили, что она является одной из самых ранних киназ, которая активируется в ответе клетки на образование ДР ДНК. В случаях отсутствия ATM некоторое количество гистона H2AX фосфорилируется ДНК-ПК [32]. Процесс фосфорилирования гистона H2AX в хроматине иллюстрирует рис. 1, адаптированный из работы Stucki M. et al [33]. В 2005 году Peng Y. et al показали, что дефицит в клетках ДНК-ПК проявляется снижением активности ATM, что в свою очередь сказывается на уменьшении фосфорилирования H2AX [34]. Этот феномен был подтвержден позднее в исследованиях Shrivastav M. et al (2009) [35]. Результаты, полученные An J. et al (2010) также свидетельствуют о том, что ДНК-ПК играет не менее важную роль, чем ATM в фосфорилировании H2AX. Обе киназы функционально дополняют друг друга во время фосфорилирования H2AX в ответ на повреждение ДНК, вызванное ИИ [36]. Так, в работе Flassig R.J. et al отмечено, что фосфорилирование гистона H2AX происходит в две фазы: вначале под действием киназы ДНК-ПК, а позднее – при участии ATM. Такое двухфазное фосфорилирование H2AX способствует поддержанию сигнала о наличии повреждения ДНК для надежного его обнаружения [37].

Участие киназы ATR в образовании γH2AX установлено Ward I.M. и Chen J. (2001) при возникновении двойных разрывов нити ДНК в результате коллапса репли-

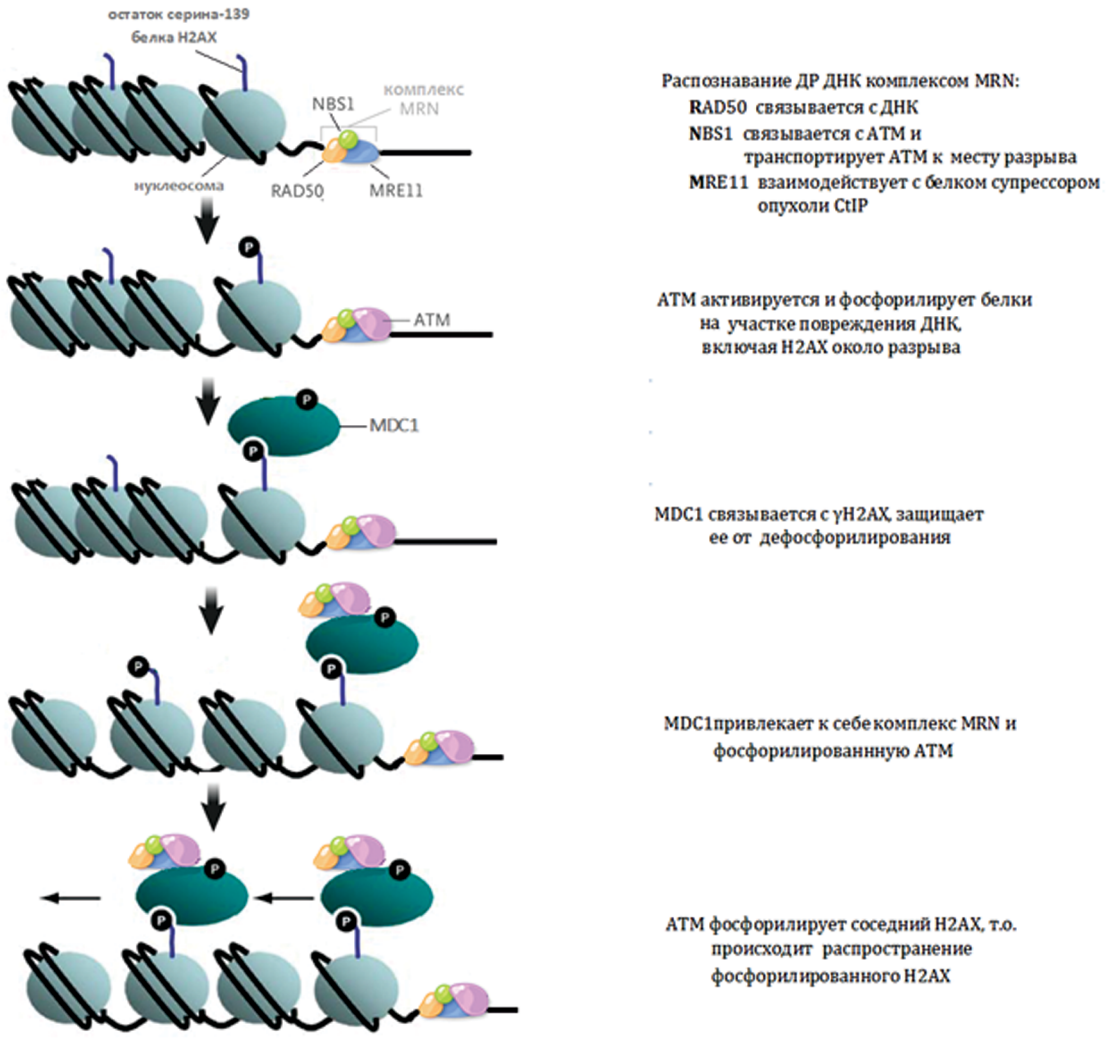

Рис. 1. Схема фосфорилирования H2AX (адаптировано из Stucki M. et al [33])
MRN – Mre11-Rad50-Nbs1- репаративный комплекс, осуществляющий репарацию ДР ДНК
NBS1 – белок, кодируемый геном NBS, мутация в этом гене ассоциирована с наследственным заболеванием Nijmegen Breakage Syndrome (синдром хромосомной неустойчивости Неймегена)
Rad50 – белок, принимающий участие в рекомбинации и рекомбинационной репарации гомологичных ДНК
MRE11 – белок, участвующий в гомологичной рекомбинации, поддержании длины теломер и репарации ДР ДНК
MDC1 – белок, привлекающий в область ДР ДНК белки репарации

Fig. 1. Scheme of H2AX phosphorylation (adapted from Stucki M. et al [33])
MRN – Mre11-Rad50-Nbs1- repair complex, performing DR DNA repair
NBS1 – protein encoded by the NBS gene, mutation in this gene is associated with the hereditary disease Nijmegen Breakage Syndrome (NBS)
Rad50 – protein involved in recombination and recombinational repair of homologous DNA
MRE11 – protein involved in homologous recombination, telomere maintenance and DR DNA repair
MDC1 – protein that attracts repair proteins to the DR DNA region

кативных вилок [38]. Следует отметить, что при репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК вслед за активацией ATM и образованием одноцепочечной ДНК запускается активация ATR [39].

В опубликованных исследованиях называются разные сроки появления фосфорилированного белка H2AX и его максимального проявления, при этом активность киназ играет решающую роль в фосфорилировании H2AX. Так, в исследованиях An J. et al (2010), использовавших для облучения дозу 4 Гр, увеличение автофосфорилирования ДНК-ПК, а также фосфорилирование белка H2AX регистрировали в первые 15–60 мин после образования ДР ДНК [36]. По данным Abramenkovs A. и Stenerlöw B. (2017), оценка изменения количества фосфорилированной ДНК-ПК дает лучшее представление о репарации ДР ДНК в первые 30 мин после индукции повреждения, чем анализ фокусов γH2AX [40]. В плане оценки значимости киназ интересно сообщение Suzuki K. et al (2006), которые отметили, что фокусы фосфорилированной киназы ATM (pATM) являются лучшим биологическим маркером радиационно-индуцированных ДР ДНК, чем фокусы γH2AX, особенно при воздействии ИИ в диапазоне малых доз (до 100 мГр) [41]. Фокусы pATM хорошо солокализиются с фокусами γH2AX. Результаты этой солоколизации согласуются с основной ролью ATM в раннем распознавании ДР ДНК. Так, в исследованиях Bakkenist C.J. и Kastan M.B. (2003) зарегистрирован максимальный уровень pATM через 5 мин после воздействия ИИ в дозе 0,5 Гр [42]. Kitagawa R. и Kastan M.B. (2005) продолжив исследование, уточнили, что при дозе облучения 0,5 Гр в клетке фосфорилируется более 50% ATM быстрее, чем за 5 мин [43]. В исследовании Yamauchi M. et al на нормальных диплоидных клетках человека линии HE49 было обна-

ружено много мелких фокусов pATM (36,9 фокус/клетка) через 15 мин после облучения в дозе 1 Гр. Их количество уменьшилось до контрольных значений через 24 ч [44]. Используя несинхронизированные клетки человека, подвергнутые облучению в дозах широкого диапазона (0,1–1 Гр), Suzuki K. et al (2006) регистрировали через 30 мин максимальное число фокусов pATM (50 фокус/клетка/Гр) при фоновом количестве 0,2 фокуса на клетку [41]. Если в качестве модели исследования использовали фибробласты кожи линии GM38, а регистрацию результатов проводили с использованием проточной цитометрии, то максимум pATM выявлялся через 2 ч при дозе облучения 0,5 Гр [45].

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

Белки хроматина, изменяя способ укладки ДНК, способны регулировать процесс ее репарации. Так, было показано, что репарация ДНК от ДР происходит с более медленной кинетикой в гетерохроматине, чем в эухроматине [46]. Для эффективной репарации ДНК необходима релаксация структуры хроматина, поскольку конденсированный хроматин не дает возможности распространения фосфорилированного H2AX в ответ на повреждение ДНК [47]. Cowell I. G. et al (2007) показали, что фосфорилирование H2AX по серину-139-му различается в зависимости от степени конденсации хроматина и происходит преимущественно в эухроматине [48]. Kruhlak M. et al (2006), применив электронную микроскопию, обнаружили уменьшение плотности хроматина на 30–40% в регионах, расположенных по обе стороны от ДР ДНК [49]. Плотность уменьшалась за счет АТФ-зависимого ремоделирования хроматина первичными сенсорами ДР ДНК (комплексом Rad17-RFC, состоящим из Rad17 и четырех небольших субъединиц репликативного комплекса RFC (RFC2, RFC3, RFC4, RFC5) и комплексом 9-1-1, включающим RAD9, HUS1 и RAD1) [50]. Изменения структуры хроматина, как показали Bakkenist C.J. и Kastan M.B. (2003), активировали киназу ATM [42], которая, в свою очередь, взаимодействует с белком KAP-1, создающим существенный барьер для репарации ДР ДНК в гетерохроматине, и, тем самым, киназа ATM вызывает релаксацию хроматина для обеспечения доступа белков репарации к месту разрыва [46]. По данным Ziv Y. et al (2006) ATM-зависимое фосфорилирование KAP-1 происходило в первые 30-60 мин после образования ДР ДНК [51]. Важно отметить, что ДР ДНК сохранялись в клетках, в которых фосфорилирование KAP-1 киназой ATM отсутствовало [52]. Аналогичные результаты были получены для маркера ДР-белка γH2AX. После облучения клеток в дозах 250–2000 мГр и ингибировании ATM доля γH2AX, связанная с гетерохроматином, составляла 60–70%, в то время как при активной киназе ATM была примерно 25% [46]. Таким образом, геометрия укладки ДНК в клетках и ее связь с белками хроматина влияют на количественный выход радиационно-индуцированных фокусов γH2AX.

Влияние фазы клеточного цикла на образование и деградацию радиационно-индуцированных фокусов γH2AX

Известно, что белок H2AX после образования ДР ДНК фосфорилируется во всех клетках, находящихся в разных фазах клеточного цикла, однако число фокусов γH2AX в зависимости от фазы цикла заметно варьирует. К примеру, после облучения клеток γ-квантами в дозе 2 Гр РИФ γH2AX образуются в большем количестве в S- и G2-фазах по сравнению с G1 [53]. Аналогичная зависимость РИФ γH2AX от стадии, в которой находится клетка во время облучения, была продемонстрирована в работе Bee L. et al (2013) при радиационном воздействии на клетки двух доз: 0,5 и 5 Гр [54]. Что касается клеток, находящихся в стадии митоза, то по данным Markova E. et al (2007), в них количество фокусов было статистически значимо меньше, чем в клетках в стадии интерфазы [21].

Остаточные радиационно-индуцированные фокусы γH2AX

Как правило, максимальное количество фокусов γH2AX наблюдается примерно через 0,25–1 час после облучения [55]. После чего количество радиационно-индуцированных фокусов уменьшается экспоненциально, но при этом даже через 24 часа после облучения может сохраняться небольшое количество фокусов. Такие фокусы в литературе называют остаточными (англ. residual) [56, 57]. В зависимости от дозы ИИ, от 10% до 70% клеток содержат остаточные фокусы γH2AX через 24 ч после облучения [58]. К этому времени их количество составляет 5–10 % от максимального значения, наблюдавшегося через 0,5 ч после радиационного воздействия [58]. После облучения покоящихся лимфоцитов в дозах более 1000 мГр доля остаточных фокусов γH2AX через 24 часа составляла 13%, а через 48 ч – 6,6% от наблюдавшихся через 30 мин после воздействия.

Наряду с дозой радиационного воздействия на длительное пребывание в клетках РИФ влияет структура хроматина. Так, ДР ДНК, локализованные в гетерохроматине, могут привести к длительному сохранению РИФ [46].

Существенный вклад в количество остаточных фокусов оказывает фаза клеточного цикла, во время которой происходило радиационное воздействие. К примеру, γ-облученные покоящиеся клетки, восстановившие ДР, во время последующей репликации ДНК сохраняли вторично образованные ДР в течение более длительного периода по сравнению с ДР, индуцированными первично [59]. Об этом же свидетельствуют исследования Alessio N. et al (2015), установивших наибольшее количество остаточных фокусов γH2AX в покоящихся мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека через 48 ч после облучения в дозах 40–2000 мГр [60].

Важным фактором, влияющим на уровень остаточных фокусов, является эффективность работы белков репарации и белковых фосфатаз 2A (PP2A) и PP4, которые ответственны за дефосфорилирование γH2AX [61, 62]. В работе Löbrich M. et al (2010) было показано, что клеточные линии, имеющие дефекты в белках репарации, сохраняют больше ДР ДНК в течение 7 сут после облучения в дозах 3 и 80 Гр [6].

Существующая оценка прогностической значимости остаточных фокусов противоречива. По мнению Banath J.P. et al (2010), присутствие в клетках остаточных фокусов γH2AX или RAD51 через 24 ч после облучения свидетельствует об их нежизнеспособности [63]. Alessio N. et at (2015) в исследованиях на мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека наблюдали только дозозависимое снижение жизнеспособности (по тесту клоногенной активности) у клеток, имеющие остаточные фокусы. Облучение клеток в дозе 2000 мГр по сравнению с дозой 40 мГр приводило к уменьшению роста колоний [60]. Оппонирующие результаты приведены Sak A. et al (2005). На 4 клеточных линиях ими не выявлено корреляции между клоногенной выживаемостью и долей клеток, которые сохраняли остаточные фо-

кусы белков γH2AX после их облучения в дозе 2 Гр [64]. Mahrhofer H. et al (2006) на 10 нормальных и опухолевых клеточных линиях также не обнаружили связи между долей клеток с долгоживущими фокусами γH2AX, индуцированными ИИ в дозах 1–4 Гр, и их клоногенной активностью [25].

Недавно с использованием модели hockey stick показано наличие статистически значимого дозового порога для остаточных фокусов γH2AX через 24, 48 и 72 ч после облучения фибробластов кожи человека [57]. Рассчитанные пороговые дозы близки к квазипороговой дозе D_q, характеризующей ширину плечевой области на кривой клоногенной выживаемости облучённых фибробластов.

Таким образом, сведения о значении остаточных фокусов в облученных клетках неоднозначны. Приводятся доказательства в пользу как снижения жизнеспособности клеток, в которых сохраняется большое и при том дозозависимое количество остаточных фокусов, так и об отсутствии их заметного влияния на клоногенность клеток.

Заключение

Анализ литературы позволил убедиться в несомненных достоинствах и информативности количественного анализа радиационно-индуцированных фокусов γH2AX. К достоинствам можно отнести:

1. Крайне высокую чувствительность, позволяющую детектировать эффекты облучения в малых и сверхмалых дозах;
2. Возможность анализа пространственного распределения сайтов репарации ДНК по объему каждого клеточного ядра;
3. Возможность исследования отклика на облучение каждой клетки в асинхронных/гетерогенных клеточных популяциях.

Однако результаты, полученные с использованием этого метода, требуют корректной интерпретации. Нужно четко понимать, что количество и кинетика фокусов γH2AX могут существенно отличаться от количества и кинетики пострадиационных изменений ДР ДНК. В настоящее время метод активно используется не только в радиобиологии, но и в онкологии, токсикологии, фармакологии, геронтологии и смежных областях науки.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Ahnstrom G, Erixon K. Radiation Induced Strand Breakage in DNA from Mammalian Cells. Strand Separation in Alkaline Solution. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine. 1973;23;3:285-9.
2. Blocher D. DNA Double Strand Breaks in Ehrlich Ascites Tumour Cells at Low Doses of X-Rays. I. Determination of Induced Breaks by Centrifugation at Reduced Speed. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine. 1982;42;3:317-28.
3. Schwartz D.C., Cantor C.R. Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. Cell. 1984;37;1:67-75.
4. Osipov A., Arkhangelskaya E., Vinokurov A., Smetanina N., Zhavoronkov A., Klokov D. DNA Comet Giemsa Staining for Conventional Bright-Field Microscopy. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15;4:6086-95. Doi: 10.3390/ijms15046086.
5. Bushmanov A., Vorobyeva N., Molodtsova D., Osipov A.N. Utilization of DNA Double-Strand Breaks for Biodosimetry of Ionizing Radiation Exposure. Environmental Advances. 2022;8:100207. Doi: 10.1016/j.envadv.2022.100207.
6. Lobrich M., Shibata A., Beucher A., Fisher A., Ensminger M., Goodarzi A.A., et al. Gamma-H2AX Foci Analysis for Monitoring DNA Double-Strand Break Repair: Strengths, Limitations and Optimization. Cell Cycle. 2010;9;4:662-9. Doi: 10.4161/cc.9.4.10764.
7. Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. The Journal of Biological Chemistry. 1998;273;10:5858-68.
8. Pantazis P., Bonner W.M. Quantitative Determination of Histone Modification. H2A Acetylation and Phosphorylation. The Journal of Biological Chemistry. 1981;256;9:4669-75.
9. Ikura T., Tashiro S., Kakino A., Shima H., Jacob N., Amunugama R., et al. DNA Damage-Dependent Acetylation and Ubiquitination of H2AX Enhances Chromatin Dynamics. Molecular and Cellular Biology. 2007;27;20:7028-40. Doi: 10.1128/MCB.00579-07.
10. Chew Y.C., Camporeale G., Kothapalli N., Sarath G., Zempleni J. Lysine Residues in N-Terminal and C-Terminal Regions of Human Histone H2A are Targets for Biotinylation by Biotinidase. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2006;17;4:225-33. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.003.
11. Xiao A., Li H., Shechter D., Ahn S.H., Fabrizio L.A., Erdjument-Bromage H., et al. WSTF Regulates the H2A.X DNA Damage Response Via a Novel Tyrosine Kinase Activity. Nature. 2009;457;7225:57-62. Doi: 10.1038/nature07668.
12. Pinto D.M., Flaus A. Structure and Function of Histone H2AX. Sub-Cellular Biochemistry. 2010;50:55-78. Doi: 10.1007/978-90-481-3471-7_4.
13. Rothkamm K., Lobrich M. Evidence for a Lack of DNA Double-Strand Break Repair in Human Cells Exposed to Very Low X-Ray Doses. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100;9:5057-62. Doi: 10.1073/pnas.0830918100.
14. Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. The Journal of Cell Biology. 1999;146;5:905-16.
15. MacPhail S.H., Banath J.P., Yu Y., Chu E., Olive P.L. Cell Cycle-Dependent Expression of Phosphorylated Histone H2AX: Reduced Expression in Unirradiated but not X-Irradiated G1-Phase Cells. Radiation Research. 2003;159;6:759-67.
16. Bonner W.M., Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J., Sedelnikova O.A., Solier S., et al. Gamma-H2AX and Cancer. Nature Reviews Cancer. 2008;8;12:957-67. Doi: 10.1038/nrc2523.
17. Wilson P.F., Nham P.B., Urbin S.S., Hinz J.M., Jones I.M., Thompson L.H. Inter-Individual Variation in DNA Double-Strand Break Repair in Human Fibroblasts Before and after Exposure to Low Doses of Ionizing Radiation. Mutation Research. 2010;683;1-2:91-7. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.10.013.
18. Nakamura A.J., Chiang Y.J., Hathcock K.S., Horikawa I., Sedelnikova O.A., Hodes R.J., et al. Both Telomeric and Non-Telomeric DNA Damage are Determinants of Mammalian Cellular Senescence. Epigenetics & Chromatin. 2008;1;1:6. Doi: 10.1186/1756-8935-1-6.
19. Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J.M. Cellular Senescence in Aging Primates. Science. 2006;311;5765:1257. Doi: 10.1126/science.1122446.
20. Nakamura A.J., Redon C.E., Bonner W.M., Sedelnikova O.A. Telomere-Dependent and Telomere-Independent Origins of Endogenous DNA Damage in Tumor Cells. Aging. 2009;1;2:212-8. Doi: 10.18632/aging.100019.
21. 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. International Journal of Radiation Biology. 2007;83;5:319-29. Doi: 10.1080/09553000601170469.
22. Costes S.V., Boissiere A., Ravani S., Romano R., Parvin B., Barcellos-Hoff MH. Imaging Features that Discriminate between Foci Induced by High- and Low-LET Radiation in Human Fibroblasts. Radiation Research. 2006;165;5:505-15. Doi: 10.1667/RR3538.1.
23. McManus K.J., Hendzel M.J. ATM-Dependent DNA Damage-Independent Mitotic Phosphorylation of H2AX in Normally Growing Mammalian Cells. Molecular Biology of the Cell. 2005;16;10:5013-25. Doi: 10.1091/mbc.E05-01-0065.
24. Asaithamby A., Chen D.J. Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks after Low-Dose Gamma-Irradiation. Nucleic Acids Research. 2009;37;12:3912-23. Doi: 10.1093/nar/gkp237.
25. Mahrhofer H., Burger S., Oppitz U., Flentje M., Djuzenova C.S. Radiation Induced DNA Damage and Damage Repair in Human Tumor and Fibroblast Cell Lines Assessed by Histone H2AX Phosphorylation. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. 2006;64;2:573-80. Doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.09.037.
26. Schollnberger H., Mitchel R.E., Crawford-Brown D.J., Hofmann W. Nonlinear Dose-Response Relationships and Inducible Cellular Defence Mechanisms. Journal of Radiological Protection. 2002;22;3A:A21-5.
27. Kotenko K.V., Bushmanov A.Y., Ozerov I.V., Guryev D.V., Anchishkina N.A., Smetanina N.M., et al. Changes in the Number of Double-Strand DNA Breaks in Chinese Hamster V79 Cells Exposed to Gamma-Radiation with Different Dose Rates. International Journal of Molecular Sciences. 2013;14;7:13719-26. Doi: 10.3390/ijms140713719.
28. Neumaier T., Swenson J., Pham C., Polyzos A., Lo A.T., Yang P., et al. Evidence for Formation of DNA Repair Centers and Dose-Response

Nonlinearity in Human Cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109;2:443-8. Doi: 10.1073/pnas.1117849108.
29. Masuda Y., Kamiya K. Molecular Nature of Radiation Injury and DNA Repair Disorders Associated with Radiosensitivity. International Journal of Hematology. 2012;95;3:239-45. Doi: 10.1007/s12185-012-1008-y.
30. Durocher D., Jackson S.P. DNA-PK, ATM and ATR as Sensors of DNA Damage: Variations on a Theme? Current Opinion in Cell Biology. 2001;13;2:225-31.
31. Paull T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M. A Critical Role for Histone H2AX in Recruitment of Repair Factors to Nuclear Foci after DNA Damage. Current Biology. 2000;10;15:886-95.
32. Burma S., Chen B.P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D.J. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276;45:42462-7. Doi: 10.1074/jbc.C100466200.
33. Stucki M., Jackson S.P. Gamma-H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-Damage-Response Machinery to Broken Chromosomes. DNA Repair. 2006;5;5:534-43. Doi: 10.1016/j.dnarep.2006.01.012.
34. Peng Y., Woods R.G., Beamish H., Ye R., Lees-Miller S.P., Lavin M.F., et al. Deficiency in the Catalytic Subunit of DNA-Dependent Protein Kinase Causes Down-Regulation of ATM. Cancer Research. 2005;65;5:1670-7. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3451.
35. Shrivastav M., Miller C.A., De Haro L.P., Durant S.T., Chen B.P., Chen D.J., et al. DNA-PKcs and ATM Co-Regulate DNA Double-Strand Break Repair. DNA Repair. 2009;8;8:920-9. Doi: 10.1016/j.dnarep.2009.05.006.
36. An J., Huang Y.C., Xu Q.Z., Zhou L.J., Shang Z.F., Huang B., et al. DNA-PKcs Plays a Dominant Role in the Regulation of H2AX Phosphorylation in Response to DNA Damage and Cell Cycle Progression. BMC Molecular Biology. 2010;11:18. Doi: 10.1186/1471-2199-11-18.
37. Flassig R.J., Maubach G., Tager C., Sundmacher K., Naumann M. Experimental Design, Validation and Computational Modeling Uncover DNA Damage Sensing by DNA-PK and ATM. Molecular Biosystems. 2014;10;7:1978-86. Doi: 10.1039/c4mb00093e.
38. Ward I.M., Chen J. Histone H2AX is Phosphorylated in an ATR-Dependent Manner in Response to Replicational Stress. The Journal of Biological Chemistry. 2001;276;51:47759-62. Doi: 10.1074/jbc.C100569200.
39. Blackford A.N., Jackson S.P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. Molecular Cell. 2017;66;6:801-17. Doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
40. Abramenkovs A., Stenerlow B. Measurement of DNA-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Using Flow Cytometry Provides a Reliable Estimate of DNA Repair Capacity. Radiation research. 2017;188;6:597-604. Doi: 10.1667/RR14693.1.
41. Suzuki K., Okada H., Yamauchi M., Oka Y., Kodama S., Watanabe M. Qualitative and Quantitative Analysis of Phosphorylated ATM Foci Induced by Low-Dose Ionizing Radiation. Radiat Res. 2006;165;5:499-504. Doi: 10.1667/RR3542.1.
42. Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation. Nature. 2003;421;6922:499-506. Doi: 10.1038/nature01368.
43. Kitagawa R., Kastan M.B. The ATM-Dependent DNA Damage Signaling Pathway. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 2005;70:99-109. Doi: 10.1101/sqb.2005.70.002.
44. Yamauchi M., Oka Y., Yamamoto M., Niimura K., Uchida M., Kodama S., et al. Growth of Persistent Foci of DNA Damage Checkpoint Factors is Essential for Amplification of G1 Checkpoint Signaling. DNA Repair. 2008;7;3:405-17. Doi: 10.1016/j.dnarep.2007.11.011.
45. Enns L., Rasouli-Nia A., Hendzel M., Marples B., Weinfeld M. Association of ATM Activation and DNA Repair with Induced Radioresistance after Low-Dose Irradiation. Radiation Protection Dosimetry. 2015;166;1-4:131-6. Doi: 10.1093/rpd/ncv203.
46. Goodarzi A.A., Noon A.T., Deckbar D., Ziv Y., Shiloh Y., Lobrich M., et al. ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. Molecular Cell. 2008;31;2:167-77. Doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.017.
47. Kim J.A., Kruhlak M., Dotiwala F., Nussenzweig A., Haber J.E. Heterochromatin is Refractory to Gamma-H2AX Modification in Yeast and Mammals. The Journal of Cell Biology. 2007;178;2:209-18. Doi: 10.1083/jcb.200612031.
48. Cowell I.G., Sunter N.J., Singh P.B., Austin C.A., Durkacz B.W., Tilby M.J. Gamma-H2AX Foci form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation. PloS One. 2007;2;10:e1057. Doi: 10.1371/journal.pone.0001057.
49. Kruhlak M.J., Celeste A., Dellaire G., Fernandez-Capetillo O., Muller W.G., McNally J.G., et al. Changes in Chromatin Structure and Mobility in Living Cells at Sites of DNA Double-Strand Breaks. The Journal of Cell Biology. 2006;172;6:823-34. Doi: 10.1083/jcb.200510015.
50. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K., Linn S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. Annual Review of Biochemistry. 2004;73:39-85. Doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723.
51. Ziv Y., Bielopolski D., Galanty Y., Lukas C., Taya Y., Schultz D.C., et al. Chromatin Relaxation in Response to DNA Double-Strand Breaks is Modulated by a Novel ATM- and KAP-1 Dependent Pathway. Nature Cell Biology. 2006;8;8:870-6. Doi: 10.1038/ncb1446.
52. Goodarzi A.A., Kurka T., Jeggo P.A. KAP-1 Phosphorylation Regulates CHD3 Nucleosome Remodeling during the DNA Double-Strand Break Response. Nature Structural & Molecular Biology. 2011;18;7:831-9. Doi: 10.1038/nsmb.2077.
53. Beucher A., Birraux J., Tchouandong L., Barton O., Shibata A., Conrad S., et al. ATM and Artemis Promote Homologous Recombination of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks in G2. The EMBO Journal. 2009;28;21:3413-27. Doi: 10.1038/emboj.2009.276.
54. Bee L., Fabris S., Cherubini R., Mognato M., Celotti L. The Efficiency of Homologous Recombination and Non-Homologous end Joining Systems in Repairing Double-Strand Breaks during Cell Cycle Progression. PloS One. 2013;8;7:e69061. Doi: 10.1371/journal.pone.0069061.
55. Belov O., Chigasova A., Pustovalova M., Osipov A., Eremin P., Vorobyeva N., et al. Dose-Dependent Shift in Relative Contribution of Homologous Recombination to DNA Repair after Low-LET Ionizing Radiation Exposure: Empirical Evidence and Numerical Simulation. Curr Issues Mol Biol. 2023;45;9:7352-73. Doi: 10.3390/cimb45090465.
56. Osipov A., Chigasova A., Yashkina E., Ignatov M., Fedotov Y., Molodtsova D., et al. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts. Cells. 2023;12;8:1209. Doi: 10.3390/cells12081209.
57. Osipov A., Chigasova A., Belov O., Yashkina E., Ignatov M., Fedotov Y., et al. Dose Threshold for Residual γH2AX, 53BP1, pATM and p-p53 (Ser-15) Foci in X-ray Irradiated Human Fibroblasts. International Journal of Radiation Biology. 2025;101;3:254-63. Doi: 10.1080/09553002.2024.2445581.
58. Vaurijoux A., Voisin P., Freneau A., Barquinero J.F., Gruel G. Transmission of Persistent Ionizing Radiation-Induced foci Through Cell Division in Human Primary Cells. Mutation Research. 2017;797-799:15-25. Doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.03.003.
59. Minakawa Y., Atsumi Y., Shinohara A., Murakami Y., Yoshioka K. Gamma-Irradiated Quiescent Cells Repair Directly Induced Double-Strand Breaks but Accumulate Persistent Double-Strand Breaks during Subsequent DNA Replication. Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms. 2016;21;7:789-97. Doi: 10.1111/gtc.12381.
60. Alessio N., Del Gaudio S., Capasso S., Di Bernardo G., Cappabianca S., Cipollaro M., et al. Low Dose Radiation Induced Senescence of Human Mesenchymal Stromal Cells and Impaired the Autophagy Process. Oncotarget. 2015;6;10:8155-66. Doi: 10.18632/oncotarget.2692.
61. Chowdhury D., Keogh M.C., Ishii H., Peterson C.L., Buratowski S., Lieberman J. Gamma-H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. Molecular cell. 2005;20;5:801-9. Doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.003.
62. Chowdhury D., Xu X., Zhong X., Ahmed F., Zhong J., Liao J., et al. A PP4-Phosphatase Complex Dephosphorylates Gamma-H2AX Generated during DNA Replication. Molecular Cell. 2008;31;1:33-46. Doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.016.
63. Banath J.P., Klokov D, MacPhail SH, Banuelos CA, Olive PL. Residual Gamma-H2AX Foci as an Indication of Lethal DNA Lesions. BMC Cancer. 2010;10:4. Doi: 10.1186/1471-2407-10-4.
64. Sak A., Stueben G., Groneberg M., Bocker W., Stuschke M. Targeting of Rad51-Dependent Homologous Recombination: Implications for the Radiation Sensitivity of Human Lung Cancer Cell Lines. British Journal of Cancer. 2005;92;6:1089-97. Doi: 10.1038/sj.bjc.6602457.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 1024122500008-3, шифр FFZE-2025-0030).
Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.
Поступила: 20.03.2026. Принята к публикации: 25.04.2026.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Financing. The research was carried out within the framework of the state task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 1024122500008-3, code FFZE-2025-0030).
Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.
Article received: 20.03.2026. Accepted for publication: 25.04.2026.