КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ 2015 Т. 7 № 1 С. 159−176

Ки&М

АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЖИВЫХ СИСТЕМ

УДК: 577.31

Кинетическая модель репарации двунитевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при действии редкоионизирующего излучения с различной мощностью дозы

И. В. Озеров[1,2,a], А. Н. Осипов[2]

[1] Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

[2] ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна» ФМБА России, Россия, 123182, г. Москва, ул. Живописная, д. 46.

E-mail: [a] varnivey@mail.ru

Получено 4 февраля 2015 г.

В настоящей работе представлены результаты кинетического моделирования индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК, а также формирования скоплений (фокусов) фосфорилированного гистона H2AX (γ-H2AX) и белка Rad 51 в местах образования двунитевых разрывов, индуцированных воздействием редкоионизирующего излучения с различной мощностью и продолжительностью, в первичных фибробластах человека. Модель описывает основные механизмы репарации двунитевых разрывов: НГСК (негомологичное соединение концов) и ГР (гомологическая рекомбинация) и учитывает взаимодействия ряда белков (ДНК-ПКкс, ATM, Ku70/80, XRCC1, XRCC4, Rad51, ФРА и др.), участвующих в репарации двунитевых разрывов ДНК, на основе закона действующих масс и кинетики Михаэлиса-Ментен. Для тренировки и подтверждения статистической достоверности модели были использованы литературные данные по кинетике репарации двунитевых разрывов, а также данные по кинетике формирования и деградации фокусов белков репарации γ-H2AX и Rad51 в местах репарации двунитевых разрывов ДНК после облучения с различной мощностью дозы, полученные ранее нашим коллективом.

Ключевые слова: двунитевые разрывы ДНК, репарация ДНК, кинетическое моделирование, редкоионизирующее излучение, мощность дозы излучения

© 2015 Иван Витальевич Озеров, Андреян Николаевич Осипов

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ 2015 Т. 7 № 1 С. 159−176

Ки&М

АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЖИВЫХ СИСТЕМ

Kinetic model of DNA double-strand break repair in primary human fibroblasts exposed to low-LET irradiation with various dose rates

I. V. Ozerov[1,2], **A. N. Osipov**[2]

[1] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of biology, 1-12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia*
[2] *State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, 46 Zhivopisnaya st., Moscow, 123182, Russia.*

Abstract. — Here we demonstrate the results of kinetic modeilng of DNA double-strand breaks induction and repair and phosphorilated histone H2AX (γ-H2AX) and Rad51 foci formation in primary human fibroblasts exposed to low-LET ionizing radiation (IR). The model describes two major paths of DNA double-strand breaks repair: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) and considers interactions between DNA and several repair proteins (DNA-PKcs, ATM, Ku70/80, XRCC1, XRCC4, Rad51, RPA, etc.) using mass action equations and Michaelis–Menten kinetics. Experimental data on DNA rejoining kinetics and γ-H2AX and Rad51 foci formation in vicinity of double strand breaks in primary human fibroblasts exposed to low-LET IR with various dose rates and exposure times was utilized for training and statistical validation of the model.

Keywords: DNA double-strand breaks, DNA repair, kinetic modeling, low-LET ionizing radiation, dose rate

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 159–176 (Russian).

© 2015 Иван Витальевич Озеров, Андреян Николаевич Осипов

Введение

Воздействие ионизирующего излучения (ИИ) на живые клетки приводит к образованию целого спектра разнообразных повреждений ДНК, включая двунитевые и однонитевые разрывы ДНК, повреждения азотистых оснований и сахаро-фосфатного остова молекулы ДНК [Téoule R., 1987; O'Neill and Fielden, 1993; Nakajima et al., 1996]. Двунитевые разрывы (ДР) составляют относительно небольшую часть этих повреждений, но именно они являются основным триггером, определяющим дальнейшую судьбу клетки [Hoeijmakers, 2001; Wyman and Kanaar, 2006; Harper and Elledge, 2007; Jackson and Bartek, 2009]. Клеточный ответ на воздействие ионизирующей радиации напрямую зависит от числа накопленных ДР ДНК и кинетики их репарации. Он может включать такие процессы, как остановка клеточного цикла, активация процессов репарации ДНК и запуск программ клеточной гибели по путям апоптоза или автофагии [Goodarzi et al., 2010; Rodriguez-Rocha et al., 2011].

Основными путями репарации ДР являются негомологичное соединение концов (НГСК) и гомологическая рекомбинация (ГР). Наибольший вклад в репарацию вносит процесс НГСК, ответственный за процессинг более чем 80 % всех ДР, образованных в результате действия редкоионизирующего излучения [Kakarougkas and Jeggo, 2014]. Поскольку кроме некоторых особых случаев для протекания ГР необходима сестринская хроматида, которая используется в качестве матрицы для репарации поврежденной хроматиды, содержащей ДР, репарация по пути ГР активна преимущественно в S и G2 фазах клеточного цикла. В этих фазах клеточного цикла клетки млекопитающих наряду с НГСК активно используют ГР для репарации двунитевых разрывов [Shrivastav et al., 2005].

Классическими методами, позволяющими оценить степень фрагментации ДНК и, таким образом, число ДР, являются метод пульсгель электрофореза и метод ДНК-комет [Ostling and Johanson, 1984; Olive et al., 1990; Wojewodzka et al., 2002; Osipov et al., 2014]. В связи с развитием индустрии флуоресцентно меченых антител широкое распространение получили методы, основанные на анализе изображений ядер клеток с флуоресцентными метками, закрепленными на антителах к различным белкам-маркерам ДР ДНК. Одними из наиболее распространенных маркеров ДР являются фосфорилированная форма гистона H2AX (γ-H2AX) для всех разрывов и белок Rad51, являющийся специфическим маркером тех ДР, репарация которых идет по пути ГР. Скопления белков маркеров в области ДР называют фокусами соответствующих белков.

В связи со стремительным накоплением численных данных по кинетике индукции и репарации ДР ДНК, а также по кинетике формирования отдельных комплексов, участвующих в этом процессе, в последнее время стали появляться работы по математическому моделированию процессов репарации ДР в клетках различных типов и при различных параметрах облучения. Как правило, такие модели представляют собой системы дифференциальных уравнений различной сложности. Простейшие из них основаны на учёте эмпирических закономерностей формирования и репарации повреждений ДНК и включают всего 2–3 уравнения [Tobias, 1985; Guerrero et al., 2002; Metzger and Iliakis, 1991; Ponomarev et al., 2014], в то время как более сложные основаны на уравнениях химической кинетики, описывающих поведение отдельных молекул-участниц репарационных комплексов (ATM, ДНК-ПК, XRCC4, ФРА, Artemis и др.), и включают десятки уравнений [Cucinotta et al., 2000; Cucinotta et al., 2008; Taleei and Nikjoo, 2013a; Taleei and Nikjoo, 2013b].

Вне зависимости от сложности подавляющее большинство моделей индукции и репарации ДР ДНК учитывают зависимость кинетики этих процессов от накопленной дозы излучения. Тем не менее, ни одна из существующих на данный момент моделей не учитывает зависимость процессов репарации от мощности дозы излучения и не может быть использована для прогноза последствий действия пролонгированного излучения. Разработка такой модели поможет существенно улучшить понимание происходящих в поврежденных клетках процессов в зависимости от мощности дозы излучения и в дальнейшем помочь в выявлении оптимальных режимов радиотерапии онкологических заболеваний. Кроме того, создание кинетических моделей часто

позволяет пролить свет на молекулярные механизмы и роль отдельных молекул-участниц в моделируемых процессах.

Общий вид кинетической модели репарации ДР ДНК

При составлении модели были использованы представления о наличии двух типов двунитевых повреждений ДНК: простых и сложных двунитевых разрывов [Michalik and Frankenberg, 1994]. В то время как простые разрывы могут быть немедленно устранены с помощью одного из механизмов репарации ДР ДНК, сложные требуют специального предпроцессинга, поскольку их формирование сопровождается появлением дополнительных повреждений, таких как образование пиримидиновых димеров, неэнзиматическое метилирование оснований и др. Кроме того, различные механизмы репарации, НГСК и ГР так же имеют значительно различающуюся кинетику, что было отражено при составлении модели.

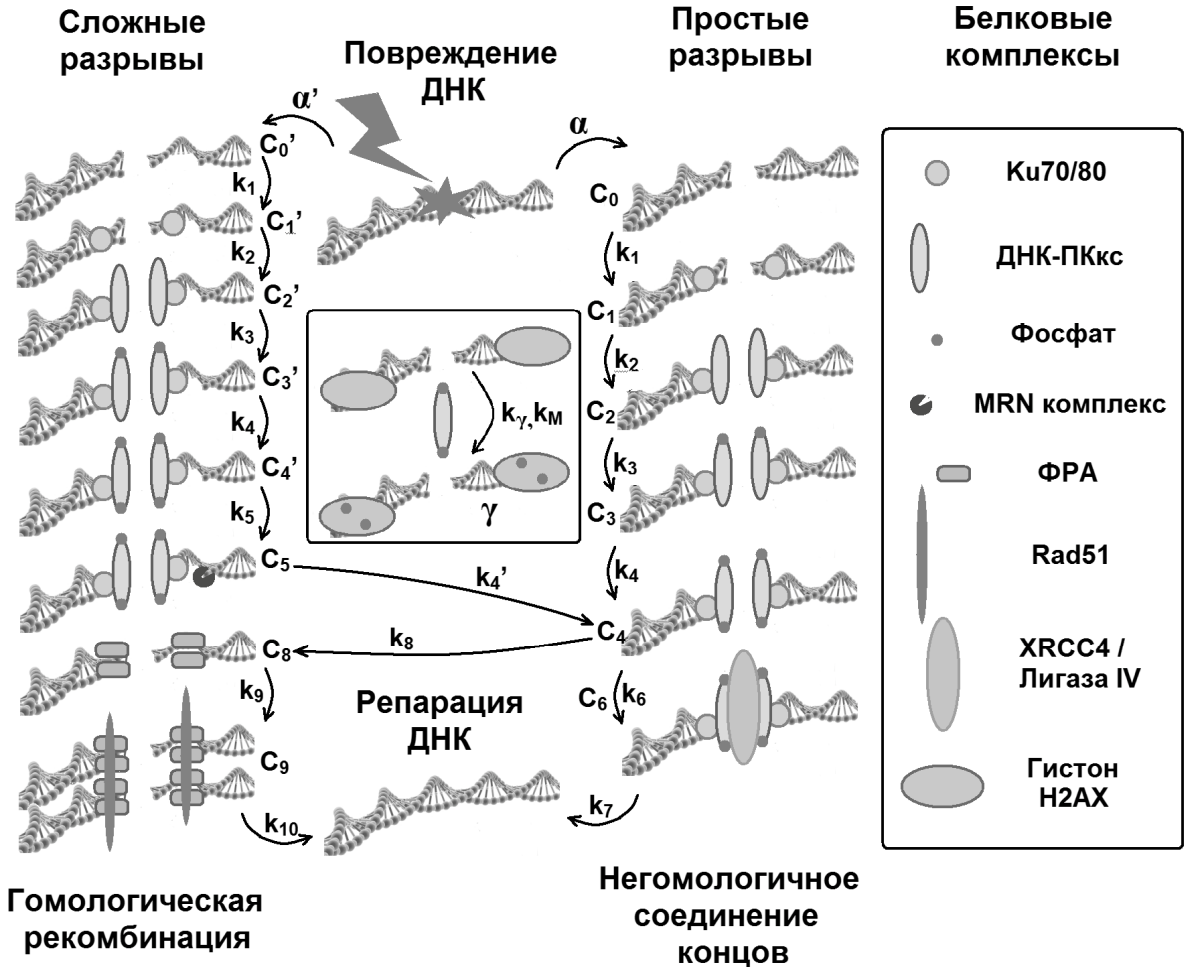

Рис. 1. Общая схема составленной кинетической модели репарации ДР ДНК. Стрелками показаны химические реакции, буквами обозначены концентрации комплексов ДНК-белок и константы скорости реакций

Принципиальная схема составленной кинетической модели репарации приведена на рисунке 1, а первоначальный вид использованных дифференциальных уравнений приведён в формулах (1.1)–(1.17). Модель основана на представлении о последовательном образовании ряда комплексов ДНК-белок в процессе репарации ДР. Каждое из уравнений системы описывает изменение концентрации одного из компонентов системы во времени. При составлении мо-

дели были использованы уравнения закона действующих масс и уравнения кинетики Михаэлиса–Ментен.

Первые два уравнения системы (формулы (1.1) и (1.2)) описывают изменение концентрации вновь образованных свободных простых C_0 и сложных C_0' ДР соответственно.

$$\frac{dC_0}{dt} = \alpha \frac{dD}{dt} - k_1 C_0 [Ku70/80], \tag{1.1}$$

$$\frac{dC_0'}{dt} = \alpha' \frac{dD}{dt} - k_1 C_0' [Ku70/80]. \tag{1.2}$$

Концентрация образованных разрывов пропорциональна мощности дозы излучения, воздействующего на клеточную популяцию в данный момент времени $\frac{dD}{dt}$ с коэффициентами α и α' соответственно. Вскоре после образования разрывов обоих типов, происходит их первичная рецепция путем связывания с белком Ku70/80. Этот процесс имеет константу скорости k_1. Здесь и далее в уравнениях концентрация свободных белков в системе обозначена названием соответствующего белка, взятого в квадратные скобки.

На следующем этапе с комплексами простых и сложных ДР ДНК с Ku70/80 (C_1 и C_1') соединяется каталитическая субъединица ДНК-протеинкиназы (ДНК-ПКкс) (формулы (1.3) и (1.4)). Скорость этого процесса определяется константой k_2. Комплекс ДНК-ПКкс и Ku70/80 собственно и составляет ДНК-ПК.

$$\frac{dC_1}{dt} = k_1 C_0 \ [Ku70/80] - k_2 C_1 \ [\text{ДНКПКкс}], \tag{1.3}$$

$$\frac{dC_1'}{dt} = k_1 C_0' [Ku70/80] - k_2 C_1' \ [\text{ДНКПКкс}]. \tag{1.4}$$

Далее происходит двухступенчатое автофосфорилирование комплексов ДР ДНК и ДНК-ПК (C_2 и C_2') с образованием активированных форм этих комплексов, фосфорилированных по одному (C_3 и C_3'), а затем по двум остаткам серина (C_4 и C_4'). Существуют различные мнения насчёт порядка реакций автофосфорилирования ДНК-ПК. Если каждая активированная молекула ДНК-ПК фосфорилирует собственный остаток серина, то реакция автофосфорилирования имеет первый порядок, в то время как если фосфорилирование одной молекулы ДНК-ПК происходит с использованием каталитического центра другой — второй порядок. Точного ответа на вопрос о том, какой из этих сценариев соответствует действительности, пока нет. В описываемой модели было использовано представление о том, что обе реакции имеют первый порядок с константами скорости k_3 и k_4 соответственно.

$$\frac{dC_2}{dt} = k_2 C_1 \ [\text{ДНКПКкс}] - k_3 C_2, \tag{1.5}$$

$$\frac{dC_2'}{dt} = k_2 C_1' \ [\text{ДНКПКкс}] - k_3 C_2', \tag{1.6}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = k_3 C_2 - k_4 C_3, \tag{1.7}$$

$$\frac{dC_3'}{dt} = k_3 C_2' - k_4 C_3'. \tag{1.8}$$

В процессинге сложных двунитевых разрывов может участвовать целый ряд белков и их комплексов, таких как MRN-комплекс, Artemis, ДНК-полимераза δ и др. Очевидно, что процессинг разных типов повреждений, сопутствующих ДР, в частности аддуктов оксо-гуа, пиримидиновых димеров, модификаций отдельных оснований, может иметь различную кинетику. Тем

не менее, чтобы сократить число свободных параметров системы, мы использовали представление об универсальном механизме процессинга таких модификаций с участием MRN-комплекса. Образование процессингого комплекса ДР ДНК – ДНК-ПК – MRN (C_5) происходит с константой скорости k_5 .

$$\frac{dC_4'}{dt} = k_4 C_3' - k_5 C_4' [MRN]. \tag{1.9}$$

После окончания процессинга дополнительных повреждений MRN-комплексом происходит его диссоциация от комплекса с ДР и, таким образом, с этого момента различие между кинетикой репарации простых и сложных разрывов исчезает, а комплексы бывших сложных ДР пополняют пул активированных комплексов ДНК-ПК с простыми ДР (C_4).

$$\frac{dC_5}{dt} = k_5 C_4' [MRN] - k_4' C_5. \tag{1.10}$$

Дальнейшая репарация двунитевых разрывов происходит по одному из двух основных путей: НГСфК и ГР. Ключевым белковым комплексом, осуществляющим лигирование концов ДНК по механизму НГСК, является комплекс XRCC4/Лигаза 4. Скорость образования комплексов ДР – XRCC4/Лигаза 4 (C_6) из активированных комплексов ДР – ДНК-ПКкс определяется константой k_6, а скорость их деградации — константой k_7 . В результате все белки комплекса диссоциируют, а двунитевой разрыв исчезает.

$$\frac{dC_4}{dt} = k_4 C_3 + k_4' C_5 - k_6 C_4 [XRCC4 / LigIV] - k_8 C_4, \tag{1.11}$$

$$\frac{dC_6}{dt} = k_6 C_4 [XRCC4 / ЛигазаIV] - k_7 C_6. \tag{1.12}$$

В случае репарации ДР по пути гомологической рекомбинации в начале происходит связывание поврежденного участка ДНК с множеством единиц белка фактора репликации А (ФРА). Поскольку ФРА находится в большом избытке, в построенной модели реакция образования комплекса ДР – ФРА имеет первый порядок с константой скорости k_8 .

Следующим этапом гомологической рекомбинации является самая медленная реакция представленной модели, в процессе которой образуется комплекс участка ДР ДНК с гомологичной хромосомой и ключевым белком, участвующим в ГР, Rad51 (C_9). В построенной модели эта реакция имеет второй порядок и её кинетика описывается константой скорости k_9 .

$$\frac{dC_8}{dt} = k_8 C_4 - k_9 C_8 [Rad51], \tag{1.13}$$

$$\frac{dC_9}{dt} = k_9 C_8 [Rad51] - k_{10} C_9. \tag{1.14}$$

Процесс деградации комплекса ДР ДНК – Rad51 имеет первый порядок и константу скорости k_{10}. В результате этого процесса все белки комплекса диссоциируют, а двунитевой разрыв исчезает.

Число двунитевых разрывов, репарация которых завершена и протекала по путям НГСК и ГР, соответствует концентрациям C_7 и C_{10} .

$$\frac{dC_7}{dt} = k_7 C_6, \tag{1.15}$$

$$\frac{dC_{10}}{dt} = k_{10} C_9. \tag{1.16}$$

Общее число всех отрепарированных ДР равно сумме ДР, репарация которых шла по путям НГСК и ГР ($C_7 + C_{10}$).

Фосфорилирование гистона H2AX происходит в широкой окрестности от непосредственного места образования двунитевого разрыва, величина которой может достигать двух мегабаз [Rogakou et al., 1998; Redon et al., 2002; Sedelnikova et al., 2003]. В реальности в этом процессе участвуют как минимум два белка семейства ФИСК: ATM и ДНК-ПК. Тем не менее, они имеют схожие механизмы активации и кинетику фосфорилирования, поэтому в ходе составления описываемой модели принято допущение, что за весь процесс фосфорилирования H2AX отвечает активированная форма ДНК-ПК. Для описания этого процесса была использована кинетика Михаэлиса–Ментен с константой скорости k_γ и константой Михаэлиса k_M . Механизмы, лежащие в основе процесса дефосфорилирования гистона γ-H2AX, в данный момент изучены недостаточно, поэтому в модели была использована простая кинетика первого порядка с константой скорости k_d .

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{k_\gamma [ДНКПК_{акт}][H2AX]}{k_M + [ДНКПК_{акт}]} - k_d \gamma. \tag{1.17}$$

В этом уравнении γ соответствует концентрации фосфорилированного белка γ-H2AX, а $[ДНКПК_{акт}]$ — это сумма концентраций всех комплексов ДР ДНК – ДНК-ПК, где ДНК-ПК фосфорилирована по одному или двум остаткам серина.

$$[ДНКПК_{акт}] = \sum_{i=3}^{6} C_i. \tag{1.17a}$$

Замена переменных, подбор коэффициентов и валидация модели

Для того чтобы упростить представленную модель и уменьшить число неизвестных в системе, была произведена замена переменных. Поскольку в модели напрямую не учитывалась возможность экспрессии рассматриваемых белков, было введено понятие квазипостоянного пула для каждого из белков (P_i), который складывается из концентрации свободного белка ($[E_i]$) и суммы концентраций всех комплексов, включающих этот белок в связанном виде.

$$P_i = [E_i] + \sum C_i = \text{const}. \tag{1.18}$$

Таким образом, если сделать следующую замену переменных:

$$x_i = \frac{C_i}{P}, \text{ где } P = P_1, \tag{1.19}$$

$$p_i = 1 - \sum c_i, \tag{1.20}$$

$$K_i = P_i \times k_i, \tag{1.21}$$

то постоянные пулы всех белков, кроме первого (Ku70/80), можно включить в новые масштабированные константы скоростей соответствующих реакций (K_i). Единственный оставшийся в системе параметр P — является масштабирующим коэффициентом, определяющим размерность всех концентраций, участвующих в системе. Ниже приведен окончательный вид уравнений системы (формулы (1.22)–(1.38)), полученный в результате описанной замены переменных.

$$\frac{dx_0}{dt} = \frac{\alpha}{P} \cdot \frac{dD}{dt} - K_1 x_0 (1 - p_1), \tag{1.22}$$

$$\frac{dx_0'}{dt} = \frac{\alpha'}{H} \cdot \frac{dD}{dt} - K_1 x_0' (1 - p_1), \tag{1.23}$$

$$\frac{dx_1}{dt} = K_1 x_0 (1 - p_1) - K_2 c_1 \ (1 - p_2), \tag{1.24}$$

$$\frac{dx_1'}{dt} = K_1 x_0' (1 - p_1) - K_2 x_1' (1 - p_2), \tag{1.25}$$

$$\frac{dx_2}{dt} = K_2 x_1 \ - k_3 x_2, \tag{1.26}$$

$$\frac{dx_2'}{dt} = K_2 x_1' - k_3 x_2', \tag{1.27}$$

$$\frac{dx_3}{dt} = k_3 x_2 - k_4 x_3, \tag{1.28}$$

$$\frac{dx_3'}{dt} = k_3 x_2' - k_4 x_3', \tag{1.29}$$

$$\frac{dx_4'}{dt} = k_4 x_3' - K_5 x_4' (1 - p_5), \tag{1.30}$$

$$\frac{dx_5}{dt} = K_5 x_4' (1 - p_5) - k_4' x_5, \tag{1.31}$$

$$\frac{dx_4}{dt} = k_4 x_3 + k_4' x_5 - K_6 x_4 (1 - p_6) - k_8 x_4, \tag{1.32}$$

$$\frac{dx_6}{dt} = K_6 x_4 (1 - p_6) - k_7 x_6, \tag{1.33}$$

$$\frac{dx_8}{dt} = k_8 x_4 - K_9 x_8 (1 - p_9), \tag{1.34}$$

$$\frac{dx_9}{dt} = K_9 x_8 (1 - p_9) - k_{10} x_9, \tag{1.35}$$

$$\frac{dx_7}{dt} = k_7 x_6, \tag{1.36}$$

$$\frac{dx_{10}}{dt} = k_{10} x_9, \tag{1.37}$$

$$\frac{d\Gamma}{dt} = \frac{K_\gamma [ДНКПК_{акт}](1 - \Gamma)}{K_m + [ДНКПК_{акт}]} - k_d \Gamma. \tag{1.38}$$

В последнем уравнении:

$$\Gamma = \frac{\gamma}{P}, \ K_M = \frac{k_M}{P}, \ K_\gamma = P_\gamma \times k_\gamma, \tag{1.39}$$

$$P_\gamma = [H2AX] + \gamma. \tag{1.40}$$

В результате была получена система из 17 уравнений, содержащая 17 свободных параметров. Подбор коэффициентов проводился последовательно с помощью модифицированного алгоритма Левенберга–Марквардта с использованием открытого кода из проекта SciPy [Marquardt, 1963; Gill and Murray, 1978; Millman and Aivazis, 2011]. Чтобы избежать появления решений, не несущих физического смысла, на возможные значения свободных параметров были наложены некоторые ограничения. Кроме того, был использован генератор теплового шума, чтобы лучше исследовать пространство значений параметров и избежать попадания в неглубокий локальный минимум. В качестве функции для минимизации была использована взвешенная сумма квадратов отклонений модельных значений от экспериментальных. Весовые коэффициенты имели бóльшие значения для малозаселенных областей тренировочного набора и возрас-

тали с уменьшением экспериментальной погрешности точек. Значения всех констант, полученных в результате минимизации, приведены в таблице 1.1.

Таблица 1.1. Численные значения свободных параметров модели

Константа	Значение	Константа	Значение
α	12.8 Гр$^{-1}$	K_6	8 ч$^{-1}$
α'	3.2 Гр$^{-1}$	k_7	1.7ч$^{-1}$
P	3200	K_8	0.5 ч$^{-1}$
K_1	115 ч$^{-1}$	K_9	1.1 ч$^{-1}$
K_2	90 ч$^{-1}$	k_{10}	0.3 ч$^{-1}$
k_3	11 ч$^{-1}$	K_γ	560 ч$^{-1}$
k_4	11 ч$^{-1}$	$K_м$	2.1
k_4'	0.27 ч$^{-1}$	K_d	1.8 ч$^{-1}$
K_5	0.38 ч$^{-1}$		

Как уже было сказано выше, параметр P является масштабирующим фактором, значение которого может быть истолковано не только как полная величина пула белка Ku70/80, но и как максимальная концентрация репарационных комплексов, которые могут возникнуть в клетке. Таким образом, величина этого параметра могла быть выбрана произвольно. В нашей модели мы решили использовать значение, близкое к тем, которые были использованы в кинетических моделях других авторов, в которых был применен сходный способ замены переменных [Cucinotta et al., 2008; Taleei and Nikjoo, 2013a].

Коэффициенты α и α', определяющие скорость образования новых разрывов, были выбраны на основе литературных данных по числу ДР в клетках, подвергнутых действию γ-излучения [Masuda and Kamiya, 2012]. При этом было использовано фиксированное соотношение между долями простых и сложных ДР, равное 4:1 [Nikjoo et al., 2001].

Для подбора коэффициентов K_1 и K_2, определяющих скорости формирования комплексов ДР – Ku70/80 и ДР – ДНК-ПК соответственно, были использованы данные по скоростям этих процессов, полученные для клеток V79 с помощью метода гашения флуоресценции [Mari et al., 2006]. Характерные времена восстановления уровня флуоресценции этих комплексов до 95 % от исходного составляют 2 и 4 минуты соответственно.

Для подбора оставшихся 12 параметров были использованы литературные данные по кинетике репарации двунитевых разрывов ДНК, полученные методом пульсгель электрофореза [Kysela et al., 1993; Lobrich et al., 1998; Belli et al., 2000], и данные по кинетике образования фокусов белков γ-H2AX и Rad51 в местах репарации двунитевых разрывов ДНК в ответ на облучение с различными мощностями доз, полученные нашим коллективом [Kotenko et al., 2013; Озеров с соавт., 2014] и другими авторами [Leatherbarrow et al., 2006; Bee et al., 2013]. Все использованные данные были получены на клетках фибробластов млекопитающих линий V79, CCD34 и первичных фибробластах человека при известных параметрах облучения: накопленной дозе, мощности дозы излучения и источнике излучения. Часть этих данных была получена с использованием кобальтового источника γ-излучения (Co^{60}), а часть — с использованием излучения рентгеновской трубки с энергией квантов 50–200 кэВ.

Известно, что ОБЭ рентгеновского излучения с такой энергией квантов, рассчитанное по выходу ДР ДНК по сравнению с γ-лучами Co^{60}, варьирует в диапазоне 1.07–1.13 [Kraxenberger et al., 1998; Nikjoo and Lindborg, 2010; Kirkby et al., 2013]. Это означает, что различия в величине измеряемых показателей (доля нерепарированных ДР ДНК, число и интенсивность фокусов белков γ-H2AX и Rad51), возникающие за счет использования различных видов редкоионизирующего излучения, сравнимы с погрешностью измерений этих показателей. Поэтому данные, полученные с применением указанных видов облучения, в процессе тренировки модели могли быть использованы совместно. Всего для построения модели и подбора последних 12 свобод-

ных параметров были использованы 182 экспериментальных значения. Для статистической валидации модели 29 из них не были использованы в тренировочном наборе и были выделены в отдельный тестовый набор. Кроме того, был использован метод перекрёстной оценки устойчивости модели к небольшим модификациям тренировочной выборки путём исключения по тридцать точек. В качестве оценки устойчивости был использован аналог коэффициента детерминации q^2 (формула (1.41).

$$q^2 = 1 - \frac{\sum (y_{пред} - y_{эксп})^2}{\sum (y_{эксп} - y_{ср})^2}, \tag{1.41}$$

где $y_{пред}$ — значение, предсказанное из модели с текущими коэффициентами для данной точки, $y_{эксп}$ — экспериментальное значение, $y_{ср}$ — среднее всех экспериментальных значений данного типа. Значение q^2 для построенной модели составило 0.83, что подтверждает предсказательную силу модели и её устойчивость к изменениям в составе тренировочного набора. Для проверки асимптотической устойчивости модель была линеаризована, а затем исследована с помощью критерия Рауса–Гурвица [Pielou, 1969]. Использованные экспериментальные данные и соответствующие им модельные кривые приведены на рисунке 2.

Неожиданно большое значение для некоторых из найденных коэффициентов (K_γ = 560 ч$^{-1}$) объясняется тем, что эти коэффициенты включают в качестве множителя пул некоторого белка, хоть и имеют размерность ч$^{-1}$. Таким образом, большáя величина коэффициента технически не означает, что процесс, описываемый этим коэффициентом, имеет характерное время порядка сотен часов, а лишь говорит о высокой суммарной концентрации соответствующего белка в системе.

Средняя квадратичная ошибка данных, полученных из модели, по сравнению с экспериментальными составляет 8.31 % для тренировочного и 9.78 % для тестового наборов соответственно, что является близким к погрешности экспериментальных данных. С помощью формулы (1.42) была рассчитана интегральная чувствительность модели по каждому из коэффициентов (K_i) для нескольких целевых параметров (y_j), где t, D и $\dot{D}$ — это время, накопленная доза и мощность дозы соответствующего измерения [Kuzmina and Borisov, 2011].

$$\begin{aligned} s_j(K_i) &= \sum_{t,D,\dot{D}} \frac{\partial \ln\left(y_j(t,D,\dot{D})\right)}{\partial \ln\left(K_i\right)} \approx \\ &\approx \sum_{t,D,\dot{D}} \frac{\ln\left(y_j\left(t;D;\dot{D};K_i + \frac{\Delta K_i}{2}\right)\right) - \ln\left(y_j\left(t;D;\dot{D};K_i - \frac{\Delta K_i}{2}\right)\right)}{\ln\left(K_i + \frac{\Delta K_i}{2}\right) - \ln\left(K_i - \frac{\Delta K_i}{2}\right)}, \\ &\Delta K_i = K_i \cdot \delta K_i,\ \delta K_i = 0{,}01;\ 0{,}05;\ 0{,}10. \end{aligned} \tag{1.42}$$

В качестве целевых показателей для проверки чувствительности модели были взяты значения флуоресценции фокусов белков γ-H2AX и Rad51, а также соотношение между долями ДР, репарируемых по путям ГР и НГСК. Наиболее чувствительной по последним двум показателям модель оказалась к изменениям коэффициентов k_4' и k_8. Этот факт легко объясним, поскольку коэффициент k_8 определяет скорость образования первого комплекса гомологической рекомбинации ДР – ФРА, в то время как коэффициент k_4' определяет принципиальную разницу в скорости репарации простых и сложных разрывов путем контроля над скоростью образования дважды фосфорилированного комплекса ДР – ДНК-ПК (C_4) из сложных разрывов. Поскольку первая реакция НГСК имеет второй порядок, а первая реакция ГР — первый, то концентрация этого комплекса очевидным образом влияет на итоговое соотношение доли путей ГР и НГСК в репарации ДР ДНК.

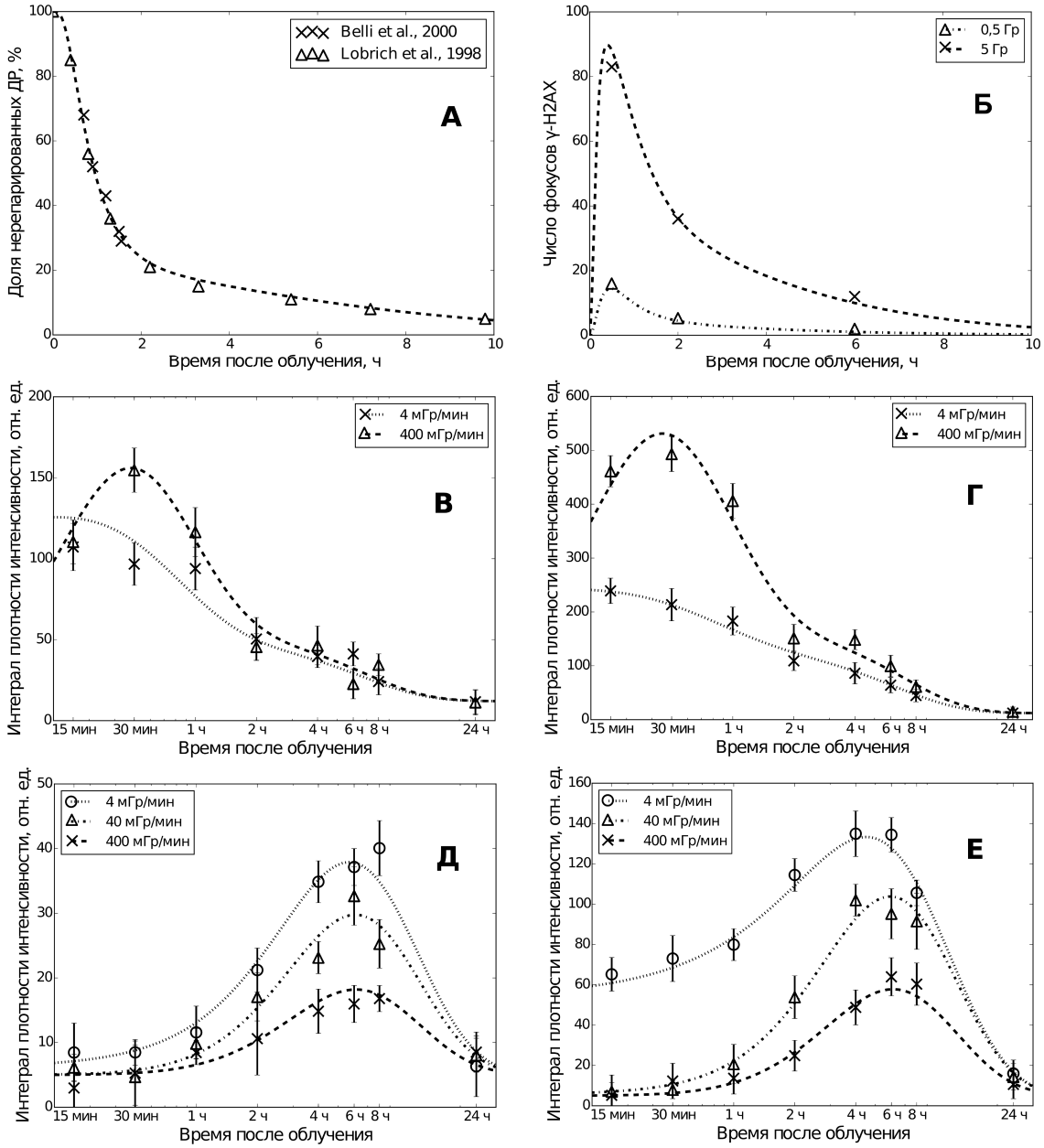

Рис. 2. А — данные по фрагментации ДНК, полученные методом пульсгель электрофореза [Lobrich et al., 1998; Belli et al., 2000]; Б — данные по интенсивности фокусов γ-H2AX через 30 мин — 6 ч после облучения [Bee et al., 2013]; В, Г — данные по интенсивности флуоресценции фокусов γ-H2AX при различных мощностях дозы излучения с накопленными дозами 0.25 Гр (В) и 1 Гр (Г); Д, Е — данные по интенсивности флуоресценции фокусов Rad51 при различных мощностях дозы излучения с накопленными дозами 0.25 Гр (Д) и 1 Гр (Е) [Озеров с соавт., 2014]

Учитывая всё, сказанное выше, можно заключить, что построенная модель является статистически достоверной, объем данных для тренировочной и тестовой выборок является достаточным, а выбранная форма уравнений хорошо подходит для описания исследуемых процессов индукции и репарации ДР ДНК. Область возможного применения модели ограничена значениями мощности дозы и интегральной накопленной дозы в экспериментах, использованных для тренировки модели (1–1000 мГр/мин, 0.25–5 Гр). Данные, использованные для тренировки и валидации модели, получены с использованием трёх клеточных линий фибробластов млеко-

питающих: клетки фибробластов легкого китайского хомяка V79, неонатальные фибробласты легкого человека CCD34 и первичные фибробласты кожи человека. При этом в ходе тренировки модели заметного несоответствия между данными для этих видов клеток не выявлено. Таким образом, данные построенной модели могут считаться достоверными для указанных клеточных линий фибробластов млекопитающих. Для исследования с помощью построенной кинетической модели особенностей репарации в других клеточных линиях необходима дополнительная параметризация.

Результаты моделирования

Кинетики образования фокусов γ-H2AX для фибробластов, облученных в различных дозах (0.25–1 Гр), полученные из модели, соответствуют экспериментальным точкам (см. рис. 2В и 2Г). Тем не менее, большим преимуществом использования моделирования является возможность получить общий вид кинетики в непрерывном виде и более полно её проанализировать. Поскольку в процессе тренировки модели как число, так и интеграл плотности интенсивности флуоресценции фокусов считались пропорциональными модельной концентрации гистона γ-H2AX (Г), результаты моделирования не предполагают различий в оценке этих величин с точностью до некоторого линейного коэффициента. Поэтому здесь и далее для удобства речь будет идти только о числе фокусов γ-H2AX, как о величине пропорциональной модельной концентрации и интегралу плотности интенсивности фокусов гистона γ-H2AX.

На рисунке 3А приведены данные моделирования по кинетике накопления и деградации фокусов γ-H2AX в течение нескольких часов после окончания облучения при различной мощности дозы. Из рисунка видно, что в случае острого облучения (400 мГр/мин) системы репарации не успевают полностью активироваться во время периода кратковременного облучения, и максимум числа фокусов репарации приходится на 30–40 минут после окончания облучения. В случае пролонгированного облучения (1, 10 мГр/мин) баланс между образованием новых ДР и активностью систем репарации ДР наступает задолго до окончания облучения. Поэтому в ходе облучения число фокусов репарации выходит на плато, держится на этом плато ещё некоторое время (~ 40 мин) после окончания облучения, а затем плавно спадает.

На рисунке 3Б показано полученное с помощью модели соответствие между числом двунитевых разрывов и числом фокусов γ-H2AX через 30 минут после окончания облучения в клетках, облученных в дозе 0.5 Гр. Рисунок демонстрирует наличие похожей линейной зависимости между этими величинами как для острого (400 мГр/мин), так и для пролонгированного (1 мГр/мин) режимов облучения. Существенные отклонения от прямой наблюдаются только в области очень малого и пикового числа фокусов. Это связано с высокой скоростью изменения числа ДР в обеих областях. Процесс фосфорилирования гистона H2AX запаздывает по сравнению с процессом образования ДР и достигает наибольшей скорости в момент, когда начинается снижение числа ДР. Этим же объясняется тот факт, что пиковое значение числа фокусов γ-H2AX, которое наступает спустя 30–40 мин после начала облучения, соответствует лишь 80 % от пикового значения числа ДР, которое приходится на момент окончания облучения. Сам по себе этот результат представляет определенный интерес, поскольку демонстрирует, что представление о том, что одному фокусу гистона γ-H2AX соответствует один ДР [Rogakou et al., 1998], является не вполне корректным в том смысле, что общее число возникших в процессе облучения ДР, как минимум, на 20 % больше числа наблюдаемых через полчаса после облучения фокусов γ-H2AX. Тем не менее, полученные данные подтверждают показанную ранее возможность использования числа и интенсивности флуоресценции фокусов γ-H2AX в качестве оценки числа ДР, индуцированных редкоионизирующим излучением как в случае острого, так и пролонгированного режимов облучения.

С помощью построенной модели может быть показан различный характер дозовой зависимости числа фокусов γ-H2AX через полчаса после окончания облучения при различной мощности дозы (см. рис. 3В). В случае пролонгированного режима облучения с малой мощностью

дозы увеличение накопленной дозы выше определенного порогового значения (порядка 0.4 Гр для облучения с мощностью 1 мГр/мин) не приводит к увеличению числа фокусов γ-H2AX, а значит и числа ДР. Такой вид дозовой зависимости легко объяснить следующим образом: в случае облучения клеток с малой мощностью дозы скорость образования ДР такова, что возможностей систем репарации оказывается достаточно для установления динамического равновесия между процессами индукции и репарации ДР. Однако в случае облучения с высокой мощностью дозы этих возможностей уже не хватает, и происходит постепенно замедляющееся накопление фокусов γ-H2AX и ДР с увеличением накопленной дозы.

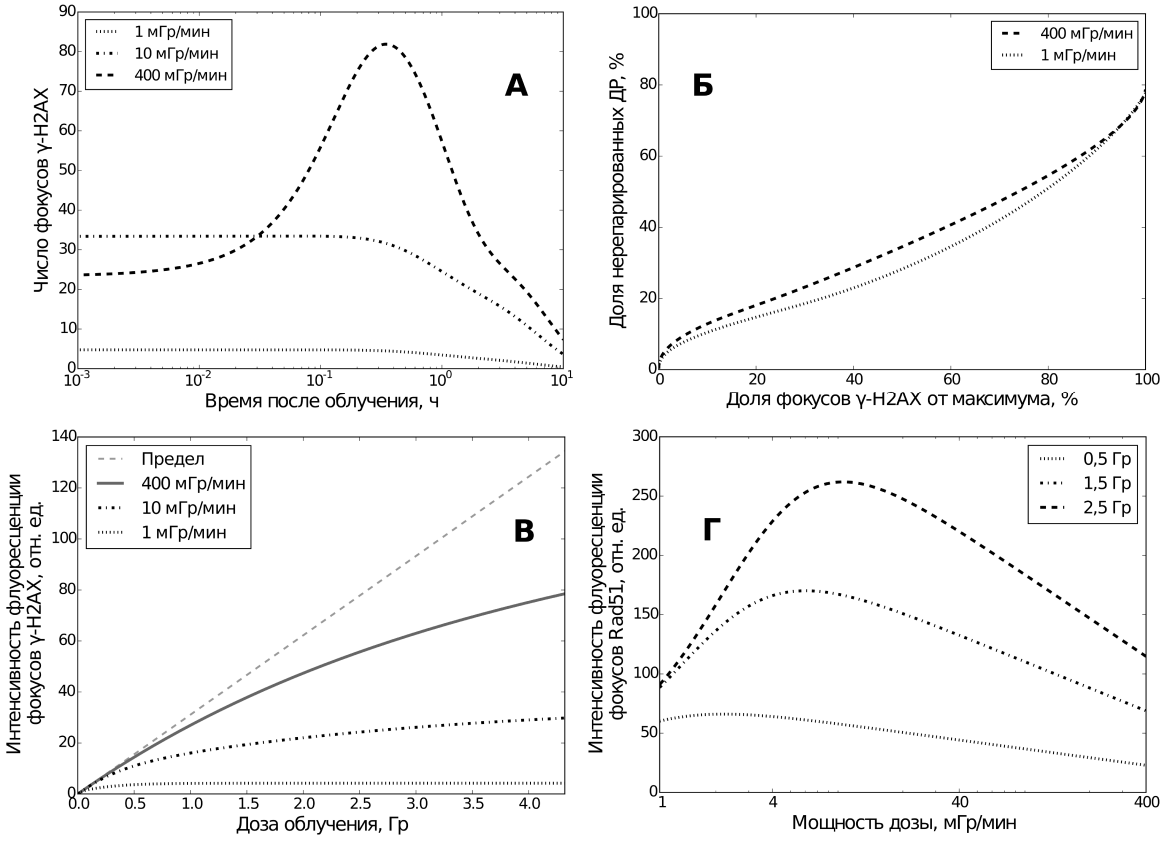

Рис. 3. А — кинетика образования и деградации фокусов γ-H2AX после окончания облучения с различной мощностью дозы (доза 1 Гр); Б — соответствие между числом ДР и числом фокусов γ-H2AX в клетках фибробластов млекопитающих, облученных с различной мощностью дозы с интегральной накопленной дозой 0.5 Гр, через 30 минут после окончания облучения; В — дозовые зависимости интенсивности флуоресценции фокусов γ-H2AX через полчаса после окончания облучения при различной мощности дозы; Г — зависимость интенсивности флуоресценции фокусов Rad51 в облученных клетках от мощности дозы при различных дозах излучения

Традиционной является линейная аппроксимация дозовой зависимости числа ДР и фокусов γ-H2AX при остром облучении клеток. Действительно, полученная из построенной модели кривая для острого облучения (400 мГр/мин) может быть аппроксимирована прямой. Более того, предельный вид этой кривой, соответствующий случаю очень высокой мощности дозы, когда скорость процессов репарации ДР пренебрежимо мала по сравнению со скоростью их образования, представляет собой прямую (на рис. 3В показана серым пунктиром). Такой результат соответствует экспериментальным данным [Kotenko et al., 2013] и похож на аналогичный график, полученный с помощью модели Куцинотты [Cucinotta et al., 2008].

Более интересной выглядит зависимость пикового по времени уровня флуоресценции Rad51 от мощности дозы излучения. В то время как с увеличением дозы происходит монотон-

ное увеличение интенсивности флуоресценции фокусов Rad51 (см. рис. 2Д и 2Е), зависимость их числа от мощности дозы имеет максимум (см. рис. 3Г). При различных значениях накопленной дозы (0.25–5 Гр) максимум флуоресценции фокусов Rad51 соответствует значениям мощности дозы в диапазоне 1.5–20 мГр/мин.

Поскольку интенсивность флуоресценции белка Rad51 напрямую связана с активностью репарации по пути ГР, можно было ожидать существование определенного оптимума значений дозы излучения и мощности дозы, при котором доля гомологической рекомбинации была бы максимальна. Для демонстрации факта наличия такого оптимума была построена тепловая диаграмма, демонстрирующая долю ДР, репарация которых протекает по пути ГР в зависимости от величины накопленной клетками дозы излучения и мощности дозы (см. рис. 4). Было показано, что соотношение доли репарации по путям ГР и НГСК может меняться в диапазоне 2–40 % в зависимости от дозы и энергии квантов используемого ИИ [Nikjoo et al., 2001]. Данные, полученные с помощью построенной в ходе данной работы модели, показывают, что мощность дозы также является принципиально важным фактором, влияющим на вклад ГР в процесс репарации ДР. Максимум вклада ГР при использовании терапевтически релевантных доз наблюдается на границе малых и средних мощностей дозы (5–20 мГр/мин). При этом, так же как и для значения флуоресценции фокусов Rad51, существует тенденция к увеличению максимума вклада ГР по мощности дозы с увеличением накопленной дозы излучения. В целом, согласно полученным данным, доля вклада ГР в диапазоне доз 0.25–2.5 Гр и мощности дозы 1–400 мГр/мин изменяется от 5 до 20 %.

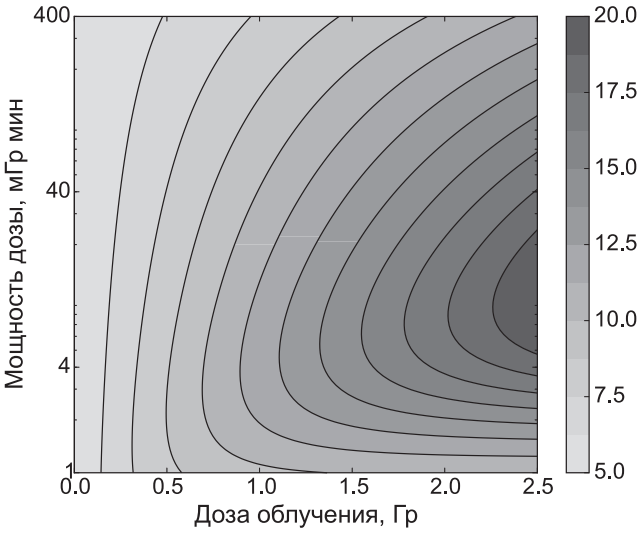

Рис. 4. Зависимость доли ДР, репарация которых идет по пути гомологической рекомбинации, от дозы излучения и мощности дозы. Уровень ГР в облученных клетках показан цветом в соответствии со шкалой в правой части рисунка

Существуют представления о том, что ГР является более точным по сравнению с НГСК механизмом репарации ДР, в процессе которого образуется меньшее число как точечных мутаций, так и хромосомных аберраций [Takata et al., 1998; Sasaki et al., 2004]. С учетом этого уменьшение доли ГР при увеличении мощности дозы и переходе от пролонгированого к острому режиму облучения может быть объяснено следующим образом: в случае острого облучения и быстрого накопления ДР в клетке, преобладает более быстрый, но менее точный путь репарации ДР – НГСК. Тем не менее, как было показано выше, даже в этом случае возможностей систем репарации может быть недостаточно для устранения всех образующихся ДР. В случае действия облучения с малой мощностью дозы (до 40 мГр/мин) клетки используют более длительный, но и более надежный путь репарации — ГР.

Полученные данные могут представлять большой практический интерес. В свете последних данных, показывающих связь между некоторыми отдаленными последствиями облучения,

такими как число мутаций, хромосомных аберраций и рядом эпигенетических эффектов, включая метилирование ДНК и деацетилирование гистонов, и соотношением вкладов путей НГСК и ГР в репарацию ДНК, можно говорить о принципиальных различиях последствий действия острого и пролонгированного режимов облучения [Bitomsky and Hofmann, 2009; Robert et al., 2011; Botrugno et al., 2012; Strozyk and Kulms, 2013]. Большие перспективы открывает возможность модулирования соотношения вкладов ГР и НГСК путем изменения мощности дозы. Более того, недавно была показана положительная корреляция между уменьшением вклада ГР в репарацию радиационно-индуцированных ДР и увеличением уровня автофагии в облученных клетках [Alessio et al., 2014]. В большинстве случаев автофагия является крайне нежелательным эффектом в случае радиотерапии опухолей. Активность этого процесса напрямую связана с вероятностью возникновения рецидивов после окончания терапии [Kuwahara et al., 2011]. Таким образом, можно предположить, что использование оптимальных режимов облучения с малой и средней мощностями дозы в радиотерапии, максимизирующих вклад репарации по пути ГР, может оказаться наиболее эффективным с точки зрения минимизации вероятности рецидива опухолей. Однако, следует иметь в виду, что регуляция репарации ДР ДНК в линиях опухолевых клеток бывает нарушена [Henning and Stürzbecher, 2003], поэтому вопрос влияния мощности дозы излучения на соотношение вкладов путей репарации в этих клетках требует дополнительного исследования.

Список литературы

Озеров И. В., Еремин П. С., Осипов А. Н., Еремин И. И., Цветкова А. Д., Гусева С. С., Иванова К. Ю., Гавриленко О. И., Пустовалова М. В., Сметанина Н. М., Грехова А. К., Лазарева Н. Л., Пулин А. А., Максимова О. А., Гордеев А. В., Бушманов А. Ю., Котенко К. В. Особенности изменения числа фокусов белков γH2AX и RAD51 в фибробластах кожи человека, подвергавшихся пролонгированному воздействию низкоинтенсивного рентгеновского излучения // Саратовский научно-медицинский журнал. — 2014. — Т. 10, № 4. — С. 935–941.

Alessio N., Del Gaudio S., Capasso S., Di Bernardo G., Cappabianca S., Cipollaro M., Peluso G., Galderisi U. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process // Oncotarget. — 2014.

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. — Vol. 8(7). — P. e69061.

Belli M., Cherubini R., Dalla Vecchia M., Dini V., Moschini G., Signoretti C., Simone G., Tabochini M., Tiveron P. DNA DSB induction and rejoining in V79 cells irradiated with light ions: a constant field gel electrophoresis study // Int J. Rad Biol. — 2000. — Vol. 76, No. 8. — P. 1095–1104.

Bitomsky N., Hofmann T.G. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling — roles of p53, p73 and HIPK2 // FEBS J. 2009. — Vol. 276, No. 21. — P. 6074–6083.

Botrugno O. A., Robert T., Vanoli F., Foiani M., Minucci S. Molecular pathways: old drugs define new pathways: non-histone acetylation at the crossroads of the DNA damage response and autophagy // Clin Cancer Res. — 2012. — Vol. 18, No. 9. — P. 2436–2442.

Cucinotta F. A., Nikjoo H., O'Neill P., Goodhead D. T. Kinetics of DSB rejoining and formation of simple chromosome exchange aberrations // Int. J. Radiat. Biol. 2000. — Vol. 76, No. 11. — P. 1463–1474.

Cucinotta F. A., Pluth J. M. Anderson J. A. Harper J. V. O'Neill P. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end joining // Radiat. Res. 2008. — Vol. 169, No. 2. — P. 214–222.

Gill P. E., Murray W. Algorithms for the solution of the nonlinear least-squares problem // SIAM Journal on Numerical Analysis. — 1978. — Vol. 15, No.5. — P. 977–992.

Goodarzi A. A., Jeggo P., Lobrich M. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax // DNA Repair (Amst.). — 2010. — Vol. 9. — P. 1273–1282.

Guerrero M., Stewart R. D., Wang J. Z., Li X. A. Equivalence of the linear–quadratic and two-lesion kinetic models // Phys. Med. Biol. — 2002. — Vol. 47. — P. 3197–3209.

Harper J. W., Elledge S. J. The DNA damage response: ten years after // Mol. Cell. — 2007. — Vol. 28. — P. 739–745.

Henning W., Stürzbecher H. W. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance // Toxicology. — 2003. — Vol. 193, No.1–2. — P. 91–109.

Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer // Nature. — 2001. — Vol. 411. — P. 366–374.

Jackson S.P.; Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease // Nature. — 2009. — Vol. 461. — P. 1071–1078.

Kakarougkas A., Jeggo P. A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism // Br J. Radiol. — 2014. — Vol. 87, No.1035. — P. 20130685. doi: 10.1259/bjr.20130685.

Kirkby C., Ghasroddashti E., Poirier Y., Tambasco M., Stewart R. D. RBE of kV CBCT radiation determined by Monte Carlo DNA damage simulations // Phys Med Biol. — 2013. — Vol. 58, No.16. — P. 5693–5704. doi: 10.1088/0031-9155/58/16/5693.

Kotenko K. V., Bushmanov A. Y., Ozerov I. V., Guryev D. V., Anchishkina N. A., Smetanina N. M., Arkhangelskaya E. Y., Vorobyeva N. Y., Osipov A. N. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to γ-radiation with different dose rates // Int. J. Mol. Sci. — 2013. — Vol. 14. — P. 13719–13726.

Kraxenberger F., Weber K. J., Friedl A. A., Eckardt-Schupp F., Flentje M., Quicken P., Kellerer A. M. DNA double-strand breaks in mammalian cells exposed to gamma-rays and very heavy ions. Fragment-size distributions determined by pulsed-field gel electrophoresis // Radiat Environ Biophys. — 1998. — Vol. 37, No. 2. — P. 107–115.

Kuwahara Y., Oikawa T., Ochiai Y., Roudkenar M. H., Fukumoto M., Shimura T., Ohtake Y., Ohkubo Y., Mori S., Uchiyama Y., Fukumoto M. Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy // Cell Death Dis. — 2011. — Vol. 2. — P. e177.

Kuzmina N., Borisov N. Handling Complex Rule-Based Models of Mitogenic Cell Signaling (on the Example of ERK Activation upon EGF Stimulation) // Int Proc Chem Biol Environ Eng. — 2011. — Vol. 5. — P. 76–82.

Kysela B. P., Arrand J. E., Michael B. D. Relative contributions of levels of initial damage and repair of double-strand breaks to the ionizing radiation-sensitive phenotype of the Chinese hamster cell mutant, XR-V15B. Part II. Neutrons // Int. J. Radiat. Biol. — 1993. — Vol. 64, No.5. — P. 531–538.

Leatherbarrow E. L., Harper J. V., Cucinotta F. A.; O'Neill P. Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation // Int J. Radiat Biol. — 2006. — Vol. 82, No. 2. — P. 111–118.

Löbrich M., Cooper P., Rydberg B. Joining of correct and incorrect DNA ends at double-strand breaks produced by high-linear energy transfer radiation in human fibroblasts // Radiat Res. — 1998. — Vol. 150, No. 6. — P. 619–626.

Mari P. O., Florea B. I., Persengiev S. P., Verkaik N. S., Brüggenwirth H. T., Modesti M., Giglia-Mari G., Bezstarosti K., Demmers J. A., Luider T. M, Houtsmuller A. B., van Gent D. C. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4 // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2006. — Vol. 103, No.49. — P. 18597–18602.

Marquardt D. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters // SIAM Journal on Applied Mathematics. — 1963. — Vol. 11, No.2. — P. 431–441.

Masuda Y., Kamiya K. Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity // Int. J. Hematol. — 2012. — Vol. 95, No. 3. — P. 239–245.

Metzger L., Iliakis G. Kinetics of DNA double-strand break repair throughout the cell cycle as assayed by pulsed field gel electrophoresis in CHO cells // Int. J. Radiat. Biol. — 1991. — Vol. 59, No. 6. — P. 1325–39.

Michalik V., Frankenberg D. Simple and complex double-strand breaks induced by electrons // Int J. Radiat Biol. — 1994. — Vol. 66, No. 5. — P. 467–470.

Millman K. J., Aivazis M. Python for Scientists and Engineers // Computing in Science & Engineering. — 2011. — Vol. 13. — P. 9–12.

Nakajima M., Takench, T., Takeshita T., Morimoto K. 8 - Hydroxydeoxyguanosine in human leukocyte DNA and daily health practice factors: effects of individual alcohol sensitivity // Environ. Health Perspect. — 1996. — Vol. 104. — P. 1336–1338.

Nikjoo H., O'Neill P., Wilson W. E., Goodhead D. V. Computational Approach for Determining the Spectrum of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation // Radiat. Res. — 2001. — Vol. 156, No. 5. — P. 577–583.

Nikjoo H., Lindborg L. RBE of low energy electrons and photons // Phys Med Biol. — 2010. — Vol. 55, No. 10. — P. 165–109.

Olive P. L., Banáth J. P., Durand R. E. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay // Radiation Research. — 1990. — Vol. 122, No. 1. — P. 86–94.

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. — Vol. 15, No. 4. — P. 6086–6095.

Ostling O., Johanson K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 1984. — Vol. 123, No. 1. — P. 291–298.

O’Neill P., Fielden E. M. Primary free radical processes in DNA // Adv. Radiat. Biol. — 1993. — Vol. 17. — P. 53–120.

Pielou E. An introduction to Mathematical Ecology. New York: Wiley-Interscience, 1969.

Ponomarev A. L., George K., Cucinotta F. A. Generalized time-dependent model of radiation-induced chromosomal aberrations in normal and repair-deficient human cells // Radiat Res. — 2014. — Vol. 181, No. 3. — P. 284–292.

Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Bonner W. Histone H2Avariants H2AX and H2AZ // Curr Opin Genet Dev. — 2002. — Vol. 12, No. 2. — P. 162–169.

Robert T., Vanoli F., Chiolo I., Shubassi G., Bernstein K. A., Rothstein R., Botrugno O. A., Parazzoli D., Oldani A., Minucci S., Foiani M. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy // Nature. — 2011. — Vol. 471, No. 7336. — P.74–79.

Rodriguez-Rocha H., Garcia-Garcia A., Panayiotidis M., Franco R. DNA damage and autophagy // Mutat. Res. — 2011. — Vol. 711, No. 1–2. — P. 158–166.

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 // J. Biol Chem. — 1998. — Vol. 273, No. 10. — P. 5858–5868.

Sasaki M. S., Takata M., Sonoda E., Tachibana A., Takeda S. Recombination repair pathway in the maintenance of chromosomal integrity against DNA interstrand crosslinks // Cytogenet Genome Res. — 2004. — Vol. 104, No. 1–4. — P. 28–34.

Sedelnikova O. A., Rogakou E. P., Panyutin I. G., Bonner W. M. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody // Radiat Res. — 2002. — Vol. 4. — P. 486–492.

Shrivastav M., De Haro L. P., Nickoloff J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice // Cell Res. — 2008. — Vol. 18, No. 1. — P. 134–147.

Strozyk E., Kulms D. The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence // Int J. Mol Sci. — 2013. — Vol. 14, No. 8. — P. 15260–15285.

Takata M., Sasaki M., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells // EMBO J. — 1998. — Vol. 17, No. 18. — P. 5497–508.

Taleei R., Nikjoo H. Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle // Mutat. Res. — 2013a. — P. 1–7.

Taleei R., Nikjoo H. The non-homologous end-joining (NHEJ) pathway for the repair of DNA double-strand breaks: I. A mathematical model // Radiat. Res. — 2013b. — Vol. 179, No. 5. — P. 530–539.

Tobias C. The repair-misrepair model in radiobiology: comparison to other models // Radiat Res Suppl. — 1985. — Vol. 8. — P. 77–95.

Téoule R. Radiation-induced DNA Damage and Its Repair // Int J. of Radiat Biol. — 1987. — Vol. 51, No. 4. — P. 573–589.

Wojewodzka M., Buraczewska I., Kruszewski M. A modified neutral comet assay: Elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody // Mutat. Res. — 2002. — Vol. 518. — P. 9–20.

Wyman, C., Kanaar R. DNA double strand break repair: all's well that ends well // Ann. Rev. Genet. — 2006. — Vol. 40. — P. 363–383.