Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова

Российской академии наук

*На правах рукописи*

Пустовалова Маргарита Витальевна

# РАННИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Специальность 03.01.01 – Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,

профессор РАН

Осипов Андреян Николаевич

Москва-2018

# ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ ..... 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ..... 12
1.1 Основные характеристики мезенхимальных стволовых клеток человека и области их применения в клеточной терапии ..... 12
1.2 Роль и место двунитевых разрывов среди повреждений ДНК ..... 18
1.3 Основные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК и их роль в судьбе клетки ..... 19
1.4 Особенности воздействия ионизирующего излучения в малых дозах на мезенхимальные стволовые клетки ..... 26
1.4.1 Репарация двунитевых разрывов ДНК ..... 26
1.4.2 Пролиферация ..... 32
1.4.3 Старение ..... 33
1.4.4 Радиационно-индуцированная нестабильность генома ..... 37
1.4.5 Канцерогенез ..... 39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ..... 45
2.1 Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток слизистой десны ..... 45
2.2 Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга ..... 46
2.3 Иммунофенотипическая характеристика выделенных мезенхимальных стволовых клеток ..... 47
2.4 Облучение ..... 47
2.5 Иммуноцитохимические исследования ..... 48
2.6 Анализ количества β- галактозидаза положительных клеток ..... 49
2.7 Статистический анализ ..... 49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ ..... 51
3.1 Анализ накопления спонтанных двунитевых разрывов ДНК в длительно-культивируемых мезенхимальных стволовых клетках человека ..... 51

3.2 Ранние радиационные эффекты ..... 58
3.2.1 Оценка изменений числа и колокализации фокусов γH2AX и pATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных рентгеновским излучением в малых дозах ..... 58
3.2.2 Сравнительные исследования изменений числа и колокализации фокусов γH2AX и pATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных в дозах 80 и 1000 мГр ..... 72
3.2.3 Анализ изменения числа фокусов γH2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках ..... 76
3.3 Отдаленные эффекты облучения ..... 79
3.3.1 Количественный анализ фокусов γH2AX в потомстве облученных клеток ..... 79
3.3.2 Оценка пролиферативной активности в потомстве облученных клеток 81
3.3.3 Оценка клеточного старения в потомстве облученных клеток ..... 82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ..... 85
ВЫВОДЫ ..... 90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ..... 91
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ..... 93
БЛАГОДАРНОСТИ ..... 122

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы

Механизмы формирования эффектов облучения в малых дозах (10-100 мГр) являются одной из наиболее дискутируемых и спорных проблем в современной молекулярной и клеточной радиационной биологии. Особый интерес вызывают исследования эффектов облучения в малых дозах в стволовых клетках, в частности, в мультипотентных мезенхимальных стволовых клетках (МСК), что связано с их высоким пролиферативным потенциалом и возможностью накопления нарушений и мутаций с последующей передачей более высокодифференцированным клеточным потомкам.

МСК являются наиболее хорошо исследованным и охарактеризованным типом клеток, используемым в регенеративной медицине. МСК описывают в литературе как субстрат-зависимые фибробластоподобные клетки, обладающие клоногенными свойствами и способностью к самообновлению [Caplan A.I., 1991; Bianco P., 2008]. Они экспрессируют определенный набор поверхностных маркеров, большинство которых являются общими с фибробластами [Hematti P., 2012], обладают мультипотентностью и способны дифференцироваться в остео-, хондро- и адипогенном направлениях, а при определенных условиях - в эндотелиальном, миогенном и нейрональном направлениях [Zuk P.A., 2001]. В клинической практике клеточная терапия нередко сопровождается различными рентгеновскими диагностическими процедурами, во время которых происходит облучение тканей в малых дозах, однако, отклик МСК на данное воздействие практически не изучен. Существуют лишь отдельные и крайне противоречивые работы на данную тему. Так, с одной стороны, показано, что облучение в малых дозах (40 мГр) индуцирует клеточное старение и нарушает процессы аутофагии в МСК костного мозга человека [Alessio N., 2015], а, с другой стороны, есть данные о том, что воздействие рентгеновского излучения в дозах 50 и 75 мГр стимулирует пролиферацию

МСК костного мозга крыс посредством активации MAPK/ERK сигнальных путей [Liang X., 2011].

В живом организме стволовые клетки в целом, и МСК в частности, отвечают за способность тканей к пострадиационному восстановлению. Несмотря на то, что МСК являются относительно радиорезистентной популяцией клеток взрослого организма [Singh S., 2012], они могут служить потенциальными мишенями для воздействия ИИ и приводить к проявлению отдаленных эффектов в различных органах и тканях [Pustovalova M., 2017].

ИИ может влиять на генетическую стабильность МСК, однако до сих пор не выяснено, влияет ли воздействие ИИ в малых дозах на трансформацию стволовых клеток в опухолевые. Использование в трансплантации сингенных и аллогенных МСК для ускорения процессов регенерации поврежденных тканей делает исследование их возможной злокачественной трансформации особенно актуальным. В последнее время появилось довольно много эпидемиологических работ, свидетельствующих об увеличении рисков возникновения злокачественных новообразований у детей и подростков после проведения компьютерных томографий, где кумулятивная доза достигает 50-60 мГр [Pearce M.S., 2012].

Известно, что воздействие ИИ на живые клетки приводит к образованию целого спектра разнообразных повреждений ДНК, включая двунитевые и однонитевые разрывы, повреждения азотистых оснований и сахаро-фосфатного остова. При этом двунитевые разрывы (ДР) составляют относительно небольшую часть этих повреждений, но именно они являются основным триггером, определяющим дальнейшую судьбу клетки [Kotenko K.V., 2013]. Клеточный ответ на воздействие ИИ напрямую зависит от числа накопленных ДР ДНК и может включать такие процессы, как остановка клеточного цикла, активация процессов репарации ДНК, индукция клеточного старения и запуск программ клеточной гибели по механизмам апоптоза или аутофагии [Rodriguez-Rocha H., 2011; Taleei R., 2015]. В связи с этим количественная оценка ДР ДНК стала использоваться как важный

показатель генотоксичности различных ДНК-повреждающих факторов, в том числе ИИ. В настоящее время наиболее чувствительным методом для оценки ДР ДНК является иммуноцитохимический анализ так называемых фокусов белков репарации ДНК – динамических микроструктур, которые образуются в местах репарации ДР. Этот метод позволяет не только определить количество ДР ДНК, но и визуально оценить их расположение в ядрах клеток. Наиболее широкое использование получил анализ фосфорилированного корового гистона H2AX (γH2AX) [Kuo L.J., 2008]. Фосфорилирование H2AX в регионах хроматина, прилегающих к концам образовавшегося разрыва, происходит в течение нескольких минут и осуществляется преимущественно киназами ATM, ATR и DNA-PKcs [Marechal A., 2013]. При этом ATM является одной из основных киназ, фосфорилирующих H2AX в ответ на образование радиационно-индуцированных ДР [Zhao J., 2017]. Корректность репарации ДР ДНК определяет дальнейшую судьбу облученной клетки и ее потомков: выживание, гибель, злокачественная трансформация.

Другим важным аспектом влияния ИИ на МСК является индукция преждевременного старения. Стареющие клетки не способны пролиферировать, однако они обладают способностью секретировать в окружающее пространство различные факторы, включая цитокины, хемокины, факторы роста и вызывать хроническое воспаление, индуцировать старение соседних клеток и способствовать их злокачественной трансформации [Ullah I., 2015]. Поскольку зачастую МСК локализованы в специализированной строме, или нише, их реакция на различные стимулы (включая ИИ) во многом зависит от микроокружения. Межклеточная сигнализация может приводить к иммунным и воспалительным реакциям, которые играют важную роль в развитии канцерогенеза.

Таким образом, исследование эффектов воздействия ИИ в МСК может внести вклад в понимание биологических процессов, происходящих в этих клетках в ответ на облучение, и помочь оценить эффекты, получаемые в

результате облучения в малых дозах, в том числе и при прохождении медицинских диагностических процедур.

**Цель и задачи исследования**

Целью диссертационной работы является изучение ранних (до 24 ч) и отдаленных (до 11 пассажа) эффектов воздействия ИИ в малых дозах в МСК человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) провести исследования закономерностей репарации ДР ДНК в культивируемых МСК человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых дозах в ранние сроки после облучения (до 24 ч);
2) изучить особенности изменений количества ДР ДНК в отдаленные сроки (до 11 клеточных пассажей) после облучения МСК человека в малой дозе рентгеновского излучения;
3) провести анализ изменений, ассоциированных с клеточным старением и нестабильностью генома в отдаленные сроки (до 11 клеточных пассажей) после облучения МСК в малой дозе рентгеновского излучения.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) кинетика образования и деградации фокусов белков репарации ДР ДНК в МСК человека, облученных в малых и средних дозах рентгеновского излучения, имеет существенные различия;
2) механизм длительного поддержания повышенного количества фокусов γH2AX в облученных в малых дозах рентгеновского излучения МСК человека является ATM-независимым;
3) воздействие рентгеновского излучения в малых дозах не приводит к отдаленным последствиям облучения, ассоциированным с накоплением ДР ДНК и клеточным старением.

**Методология и методы исследования**

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Теоретической и методологической основой диссертационной работы являются разработки отечественных и зарубежных ученых в области радиобиологии, молекулярной и клеточной биологии и биофизики. Информационную базу составляют статьи в периодических рецензируемых изданиях, материалы научных конференций, объекты интеллектуальной собственности, публикации в научных сборниках по исследуемой проблеме.

При проведении исследований были использованы:

– методы культивирования МСК;

– рентгеновская установка для облучения культуры клеток;

– иммунофлуоресцентные методы детекции белков, участвующих в репарации повреждений ДНК в облученных МСК;

– иммунофлуоресцентный метод анализа пролиферативной активности клеток;

– цитохимический метод оценки стареющих клеток;

– статистические методы обработки полученных данных.

**Научная новизна**

Впервые были получены оригинальные данные о характере изменений количества и колокализации фокусов γH2AX и фокусов активной, фосфорилированной киназы ATM (pATM) в МСК человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых (20, 40, 80 мГр) и средних дозах (160, 250 и 1000 мГр) в ранние временные сроки после облучения (0,5 ч, 4 ч, 24 ч).

Впервые проведена дифференцированная оценка количества фокусов γH2AX в пролиферирующих и покоящихся длительно культивируемых необлученных МСК при использовании маркера клеточной пролиферации - белка Ki67. Впервые на МСК человека была оценена биологическая значимость остаточных фокусов γH2AX, позволяющая опровергнуть гипотезу, связывающую их повышенное содержание в клетках после облучения в малых дозах с неэффективной репарацией или индуцибельным характером репарации ДР ДНК. Было показано, что этот феномен обусловлен образованием новых фокусов γH2AX в результате репликативного стресса, вызванного стимуляцией клеточной пролиферации. Результаты исследований, полученные на клетках, культивируемых вплоть до 11 пассажа после облучения, свидетельствуют о том, что облучение МСК человека в малых дозах не приводит к эффектам, связанным с преждевременным старением и нестабильностью генома.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Изучение закономерностей формирования ранних и отдаленных последствий воздействия ИИ в малых дозах представляет собой актуальную, имеющую общебиологическое значение задачу, а ее решение позволит получить новые научные знания, имеющие фундаментальное значение для радиационной биологии и медицины. Полученные данные вносят важный вклад в понимание биологических процессов, проходящих в длительно-культивируемых МСК и могут быть использованы в клинической практике для оптимизации протоколов экспансии стволовых клеток, необходимых для клеточной терапии. Результаты наших исследований также чрезвычайно важны для адекватной оценки опасности облучения в малых дозах. Использование фокусов γH2AX в биодозиметрии может приводить к значительной переоценке доз и риска облучения и, возможно, требует дополнительных исследований.

**Апробация работы**

Основные положения и результаты диссертационной работы представлялись и докладывались на следующих научно-практических конференциях:

- 23-ей Международной конференции по вопросам радиации и здравоохранения (CRH), г. Ваиколоа-Виллидж, Гавайи, США, 2016 г.
- Международном научно-практическом форуме «Ядерные технологии на страже здоровья», Москва, 2016 г.
- XXII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. Москва, 2017 г.
- 42-м конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS), г. Иерусалим, Израиль, 2017 г.
- XXIII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. Москва, 2018 г.
- Школе-конференции "Ильинские чтения", Москва, 2018 г.

**Достоверность результатов работы** обеспечивается проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью; статистической обработкой полученных данных с заданной вероятностью и необходимым количеством повторных исследований; сопоставлением результатов, полученных разными методами, а также сравнением с аналогичными результатами, полученными другими авторами.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 3х глав, заключения, выводов, списка использованных источников и благодарностей. Содержит 122 страницы машинописного текста, в том числе 18 рисунков. Библиография включает 212 наименований, из них в зарубежных изданиях - 199 .

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## *1.1 Основные характеристики мезенхимальных стволовых клеток человека и области их применения в клеточной терапии*

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), так же называемые мезенхимальными стромальными клетками, это тип мультипотентных стволовых клеток, которые характеризуются высоким пролиферативным потенциалом, способностью к самообновлению, а также дифференцировкой в остео-, хондро- и адипогенном направлениях. При определенных условиях МСК способны дифференцироваться во многие другие типы клеток мезодермального, эктодермального и энтодермального происхождения [Ullah I., 2015], включая эндотелиальные клетки [Konno M., 2010], кардиомиоциты, гепатоциты [Wang I., 2016] и нейральные клетки [Morikawa S., 2009]. Помимо костного мозга и жировой ткани, МСК были обнаружены во многих органах и тканях, включая скелетные мышцы [Chan C.K., 2015]. и печень [Wang Y., 2016] (Рисунок 1.1). МСК играют важную роль в восстановлении различных повреждений органов и тканей взрослого организма.

Согласно выработанным Международным обществом клеточной терапии критериям (ISCT, Ванкувер, Канада), МСК должны обладать следующими свойствами: прикрепляться к пластику при культивировании в стандартных условиях; экспрессировать на поверхности маркерные антигены CD105, CD73 и CD90, но при этом не содержать CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79α или CD19 и HLA-DR, а также дифференцироваться в остеоциты, хондроциты и адипоциты *in vitro* [Lee H.K., 2014].

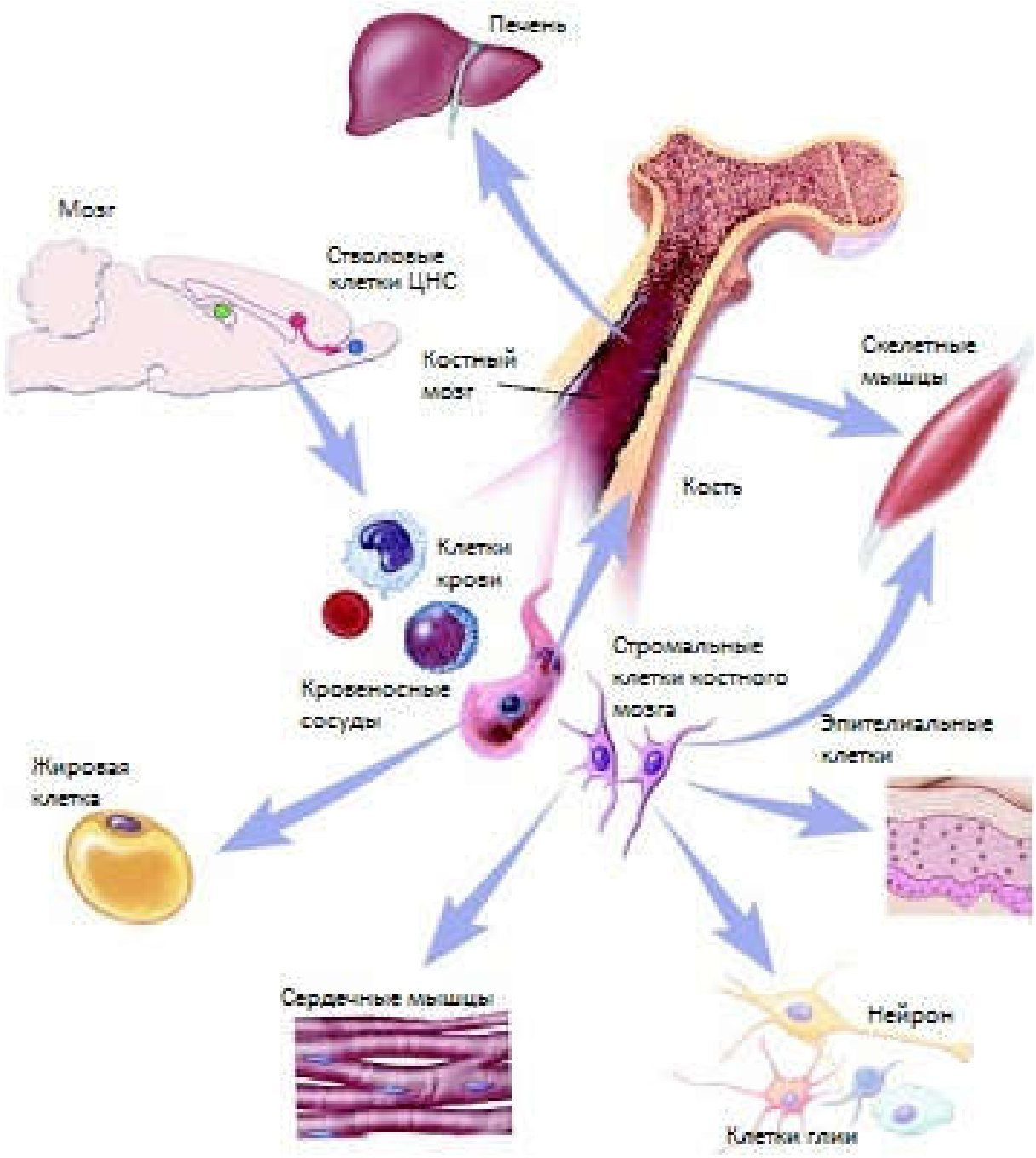


**Рисунок 1.1** Пластичность мезенхимальных стволовых клеток [Kumar R., 2010].

Способность дифференцироваться в различных направлениях, сильные иммуномодулирующие свойства, а также секреция противовоспалительных молекул позволяют МСК быть эффективным инструментом для лечения различных патологий, в том числе и для устранения последствий лучевой

терапии. Так, была показана эффективность использования МСК для лечения радиационно-индуцированных повреждений кожи [Еремин П.С., 2014], сердца [Gao S., 2017], кишечника [Gong W., 2016] и легких [Perez J.R., 2017]. При этом трансплантируемые МСК способны не только замещать поврежденные клетки, но и изменять клеточное микроокружение путем секреции различных факторов. Паракринные функции МСК осуществляются путем секреции растворимых факторов и высвобождения внеклеточных везикул, таких как экзосомы и микровезикулы (эктосомы). Внеклеточные везикулы представляют собой бислойные липосомы и содержат различные микро-РНК, мРНК и белки, которые переносятся от секретирующих клеток в клетки-реципиенты (Рисунок 1.2) [Пантелеев М.А. , 2017]. Было обнаружено, что внеклеточные везикулы, секретируемые МСК, могут иметь терапевтический эффект в большом количестве моделей болезней животных. Следовательно, внеклеточные везикулы, полученные из МСК, могут быть использованы в качестве альтернативной терапии в регенеративной медицине на основе МСК [Keshtkar S., 2018].

МСК служат важнейшим источником факторов роста и цитокинов, принимающих участие в регуляции регенерации тканей. Так, в костном мозге именно МСК продуцируют факторы, необходимые для самоподдержания гемопоэтических стволовых клеток и удержания их в нише, включая SDF-1a (фактор стромы-1a), SCF (фактор стволовых клеток), ангиопоэтин-1 и интерлейкин-7. МСК продуцируют ангиогенные и нейротрофические факторы роста, включая VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), bFGF (основной фактор роста фибробластов), HGF (фактор роста гепатоцитов), ангиопоэтин, NGF (фактор роста нервов), BDNF (нейротрофический фактор головного мозга) и GDNF (нейротрофический фактор глиальных клеток) [Калинина Н.И., 2011]. Существует предположение, что через секрецию различных факторов МСК также способны увеличивать эффективность репарации ДР ДНК [Gao S., 2017].

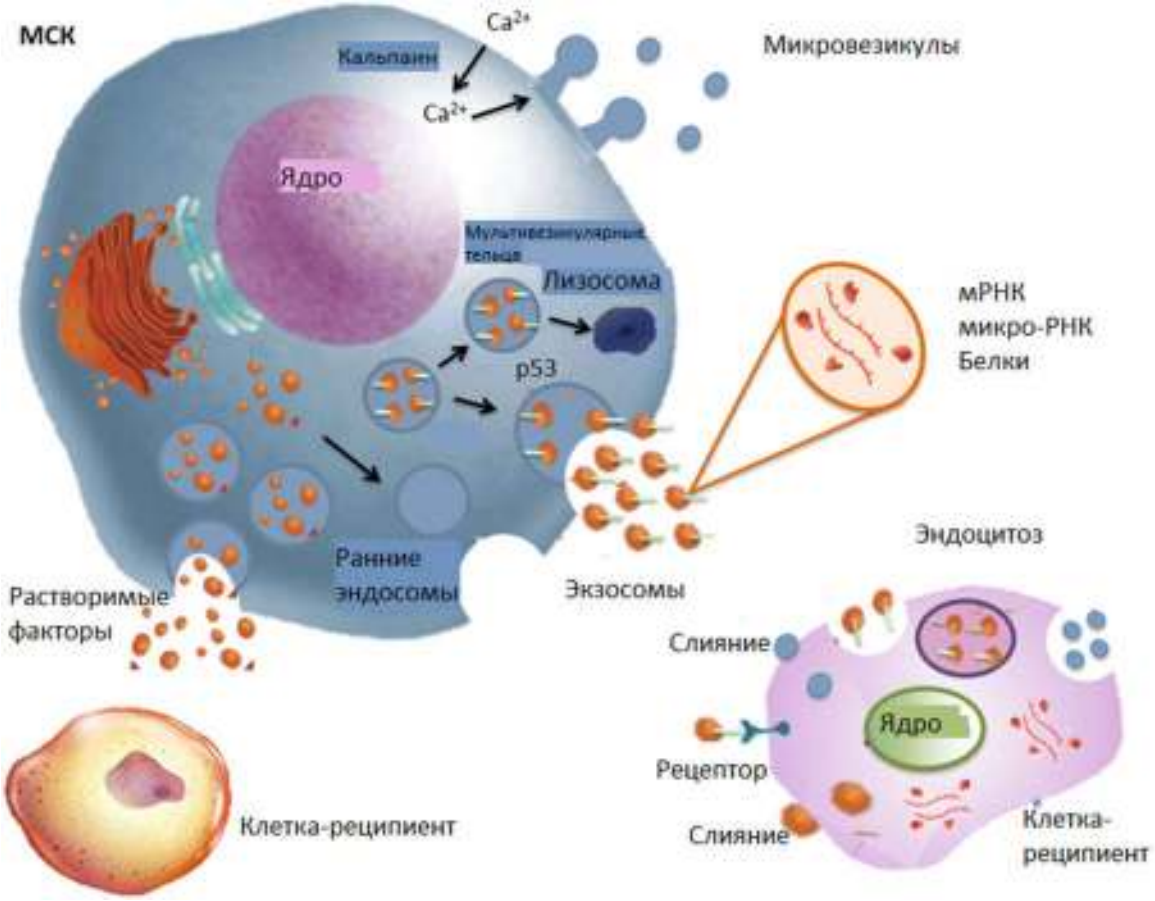


**Рисунок 1.2** Схематическое представление биогенеза микровезикул (эктосом) и экзосом [Abreu S.C., 2016].

Тем не менее, несмотря на все положительные стороны использования МСК, полноценная клеточная терапия ограничена рядом нерешенных вопросов. Одним из них является недостаточное количество МСК, получаемое от донора, что требует их экспансии *in vitro*. В то же время длительное культивирование МСК приводит к старению клеток, ухудшению клеточной дифференцировки, фокальной адгезии, дисфункции митохондрий [Geissler S., 2012], хромосомным аберрациям и увеличению риска злокачественной трансформации [Barkholt L., 2013].

Другим ограничением является необходимость выяснения последствий облучения МСК ионизирующим излучением (ИИ) в малых дозах. В настоящее время накоплен большой багаж знаний об эффектах

радиационного воздействия в больших дозах, таких как повреждение и репарация ДНК, цитогенетические нарушения, клеточная гибель. Однако до сих пор ведутся активные дискуссии о последствиях воздействия облучения в малых дозах [Morgan W.F., 2013]. В то же время ИИ успешно применяется в медицине для различных диагностических процедур, включая маммографию и компьютерную томографию. Используемые в данных процедурах малые дозы ИИ (10-100 мГр) необходимы для того, чтобы собрать данные о текущем заболевании без побочных эффектов. Тем не менее, до сих пор ведутся споры об увеличении рисков возникновения злокачественных новообразований даже при облучении в малых дозах. Возможность облучения МСК при воздействии ИИ во время лучевой терапии, где тотальная доза для немишенных органов может достигать 298 ± 194 мЗв [Uselmann A.J., 2015], также требует выяснения вопросов точности репарации ДНК после воздействия облучения в малых дозах. Существует большой риск возникновения вторичных опухолей, которые могут проявить себя спустя годы после прекращения терапии. Известно, что МСК обладают тропностью в отношении опухолей. На различных моделях было показано, что МСК могут как стимулировать рост и метастазирование опухоли за счет супрессии иммунного ответа, усиления васкулогенеза и активации эпителиально-мезенхимального перехода, так и, наоборот, оказывать ингибирующее воздействие за счет секреции факторов, вызывающих гибель опухолевых клеток [Калмыкова Н.В., 2016].

Принимая во внимание то, что МСК способны дифференцироваться в остеогенном направлении, некоторые исследователи предполагают, что в результате лучевой терапии увеличивается риск развития остеосаркомы [Alessio N., 2017]. Так у детей, подвергающихся лучевой терапии, остеосаркомы являются одним из наиболее распространенных типов вторичных опухолей [Taran S.J., 2017]. Остеосаркома связана с мутацией гена Rb1 и других генов онкосупрессоров [Chen X., 2014]. Выключение этого гена приводило к накоплению повреждений ДНК, снижению пролиферации и

индукции старения в МСК, облученных малыми дозами рентгеновского излучения [Alessio N., 2017]. В отсутствие должной элиминации выжившие поврежденные клетки являются основным источником мутаций, приводящих к их трансформации. С другой стороны есть работы, свидетельствующие о том, что МСК в стрессовых условиях увеличивают миграцию и резистентность к апоптозу клеток остеосаркомы [Vallabhaneni K.C., 2016].

Последствия воздействия ИИ в малых дозах с точки зрения возможных благоприятного, нейтрального или неблагоприятного исхода должны занимать значительное место в поле зрения будущих исследований. Особого внимания требует исследование механизмов немишенных эффектов в необлученных клетках, которые получают сигналы от облученных (эффект свидетеля), а также эффектов, наблюдаемых в потомстве облученных клеток (радиационно-индуцированная нестабильность генома) [Morgan W.F., 2013; Пелевина И.И., 2011]. В то же время стабильность генома определяется способностью клетки эффективно осуществлять ответ на повреждения ДНК, возникающие как в результате эндогенных процессов (например, при ошибках репликации), так и при воздействии внешних стрессовых факторов, в т. ч. радиационного.

Поскольку МСК самообновляются на протяжении всей жизни, они способны накапливать генетические повреждения, которые подвергают риску генетическую стабильность [Tsvetkova A., 2017]. Генетическая нестабильность тесно ассоциирована со злокачественной трансформацией. Стволовые клетки способны избежать генетической нестабильности путем массивной элиминации поврежденных клеток, что может привести к ухудшению функциональности клеточного пула. С другой стороны, устойчивость к облучению, приводящая к выживанию клеток с повреждениями ДНК, приводит к накоплению генетических нарушений. Таким образом, облученным клеточным популяциям приходится постоянно балансировать между поддержанием тканевого гомеостаза и генетической стабильностью [Harfouche G., 2010].

### *1.2 Роль и место двунитевых разрывов среди повреждений ДНК*

Ключевая роль ДНК в передаче наследственности определяет важность поддержания целостности генома. Огромный размер молекул ДНК, упакованных в хромосомы, является одним из факторов их подверженности различным повреждениям. В то же время в клетках имеются различные эволюционно-консервативные механизмы, которые обеспечивают точную репликацию ДНК, ее целостность и репарацию повреждений. Среди различных повреждений, вызванных физическими, химическими и биологическими агентами, ДР являются наиболее опасными. Именно они запускают реакции, затрагивающие почти каждый аспект клеточного метаболизма, и объединяются понятием «реакция на повреждение ДНК» (от англ. DNA damage response (DDR)) [Mladenov E., 2016].

ДР ДНК могут образовываться в результате клеточного метаболизма. Так, АФК, образующиеся во время клеточного метаболизма, окисляют основания, приводя к образованию ОР и ДР ДНК. Порядка $10^{22}$ АФК образуются каждый час в теле человека, а это примерно $10^{9}$ АФК на клетку. Некоторые долгоживущие АФК способны проникать в ядро через ядерные поры и вызывать ОР ДНК. Два ОР, расположенные напротив друг друга, приводят к образованию ДР [Chance B., 1979]. Другие физиологические процессы, приводящие к образованию ДР ДНК, включают репликацию ДНК, мейотическую рекомбинацию, а также V(D)J рекомбинацию и переключение класса тяжелой цепи иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора во время созревания лимфоидных клеток. Внешние источники образования ДР ДНК включают ИИ, УФ, а также использование различных радиомиметиков и ингибиторов топоизомераз во время опухолевой терапии [Aparicio T., 2014].

За сутки в клетке образуется около 10 000 спонтанных повреждений ДНК. Среди них только 10 являются ДР [Lieber M.R., 2010]. Скорость продукции эндогенных двунитевых разрывов (ДР) ДНК в пролиферирующих клетках млекопитающих соответствует их продукции при облучении редкоионизурующим излучением с мощностью дозы ~ 0,5

сГр/мин. В течение одного клеточного цикла в клетке образуется ~ 50 ДР ДНК, что соответствует дозе редкоионизирующего излучения ~ 1,5 Гр [Vilenchik M.M., 2003].

ДР ДНК образуются в результате разрыва сахаро-фосфатного остова антипараллельных цепей ДНК на расстоянии 10-20 пар нуклеотидов [Sutherland B.M., 2000]. В отличие от однонитевых разрывов, где потерянная генетическая информация может быть восстановлена с помощью комплементарной нити (матрицы), точное восстановление структуры ДНК после образования ДР является проблематичным. Репарация ДР ДНК часто осуществляется некорректно с потерей генетической информации и образованием хромосомных аберраций [Hoeijmakers J.H., 2009]. Потеря участков ДНК может приводить к инактивации генов супрессоров опухолей (например, потеря гетерозиготности), активировать протоонкогены или индуцировать лекарственную устойчивость во время лечения с использованием цитостатических препаратов [Ramachandran C., 1999].

Наследуемые дефекты в системе репарации ДР ДНК приводят к различным заболеваниям, таким как Атаксия телеангиэктазия [Thrasher P.,2017], синдром Ниймеген, тяжелый комбинированный иммунодефицит [van Gent D.C., 2001], а также повышенной подверженности риску возникновения рака. Эти заболевания/синдромы связаны с мутациями в генах, вовлеченных в процессы обнаружения и репарации повреждений ДНК.

### *1.3 Основные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК и их роль в судьбе клетки*

В клетках млекопитающих после распознавания ДР ДНК происходят пространственно-локализованные процессы множественной модификации белков, участвующих в DDR, с образованием динамических микроструктур, получивших в литературе название фокусы (от англ. foci) [Kotenko K.V., 2013]. Фокусы могут быть визуализированы с помощью

иммуноцитохимического окрашивания и являться важным источником информации о молекулярных процессах, лежащих в основе реакции клетки на повреждение ДНК.

Важную роль в процессах реакции на образование ДР ДНК играют модификации гистоновых белков, ведущие к изменению конформационной структуры хроматина и обеспечивающие условия для работы ферментов репарации. Среди наиболее изученных - фосфорилирование варианта корового гистона H2A - H2AX по серину-139, осуществляемое киназами ATM (мутантная при атаксии телеангиэктазии, от англ. «ataxia telangiectasia mutated»), ATR (ATM- и Rad3-родственная киназа, от англ. «ataxia telangiectasia and Rad3-related») и DNA-PKcs (каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы, от англ. «DNA-dependent protein kinase catalytic subunit»), относящихся к семейству фосфоинозитид-3-киназ [Kinner A., 2008].

H2AX является одним из наиболее консервативных вариантов H2A. Его присутствие в клетках млекопитающих варьирует от 2 до 25% от всего пула H2A в зависимости от вида, клеточной линии и исследуемой ткани [Kinner A., 2008]. В клетках человека H2AX составляет примерно 10% от всего H2A и около 0.03% H2AX фосфорилируется в ответ на образование одного ДР. Таким образом, в результате образования одного ДР ДНК модификации подвергается участок хроматина размером в 2 Mbp, что соответствует примерно 2000 молекул γH2AX [Rogakou E.P., 1998]. Однако, иммунофлуоресцентный анализ выявил, что фосфорилированию могут подвергаться участки в 15 раз большие (~30 Mbp) [Rogakou E.P., 1999; Redon C.E., 2012]. Таким образом, образующиеся вокруг ДР скопления фосфорилированного гистона H2AX (γH2AX) могут быть визуализированы путем окрашивания с использованием антител, меченных флуорохромами. Благодаря этому количество ДР ДНК и их локализация в клеточном ядре могут быть напрямую оценены путем иммуноцитохимического анализа фокусов γH2AX (рисунок 1.3). После успешной репарации ДР ДНК молекула

γH2AX подвергается дефосфорилированию фосфатазой 2A и, таким образом, фокусы γH2AX больше не обнаруживаются путем иммуноцитохимического окрашивания [Kinner A., 2008].

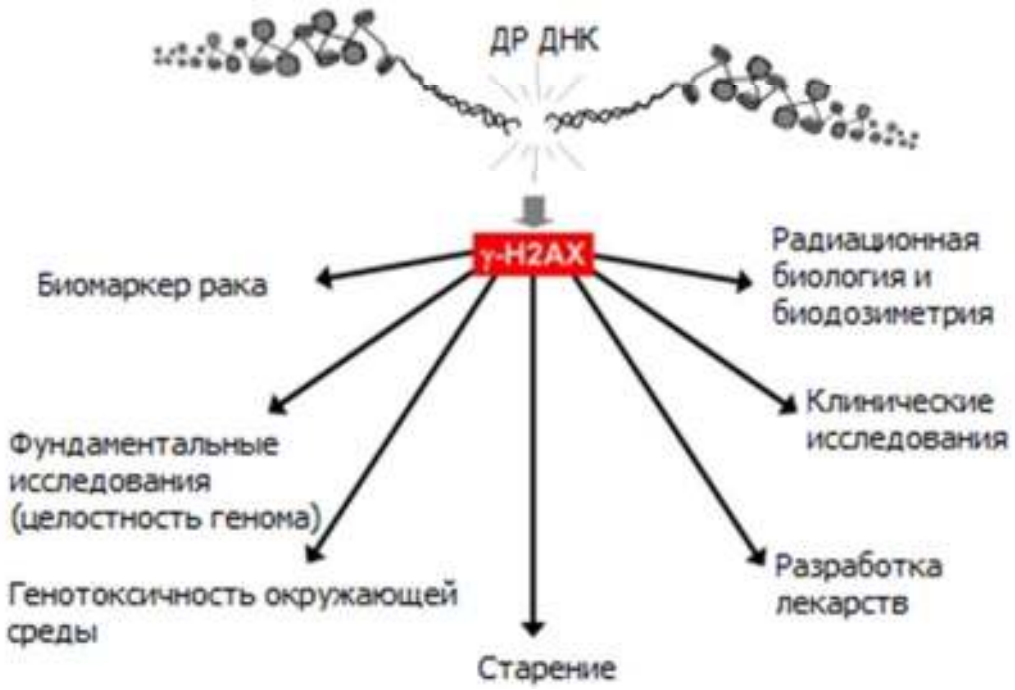


**Рисунок 1.3** Пути использования γH2AX в качестве маркера ДР ДНК. Благодаря своей чувствительности анализ фокусов γH2AX широко используется как исследователями, так и клиницистами. Вдобавок к широкому использованию в фундаментальных исследованиях (генетической нестабильности, репарации ДНК), γH2AX был определен как маркер рака (предраковых повреждений) и старения. Кроме того, γH2AX используется в радиационной биологии и биодозиметрии, а также в фармакологии и в клинических исследованиях (химиотерапия, влияние хронического воспаления и диабета на целостность генома). Наконец, анализ γH2AX является эффективным и чувствительным методом для изучения генотоксического влияния окружающей среды [Redon C.E., 2011].

Необходимо отметить, что при физиологических условиях основной киназой, фосфорилирующей H2AX вокруг ДР, индуцированных ионизирующим излучением, является ATM [Burma S., 2001], в то время как

ATR отвечает преимущественно за процессинг ДР, образующихся в результате коллапса или остановки репликативных вилок [Zhou B.B., 2000], а DNA-PKcs осуществляет быстрое фосфорилирование H2AX в экстремальных условиях [Reitsema T., 2005]. ATM присутствует в ядре в форме неактивного гомодимера. В присутствии повреждений ДНК ATM подвергается аутофосфорилированию по S1981, что приводит к диссоциации димера на активные мономеры [Bakkenist C.J., 2003] и стабилизирует киназу на участках поврежденной ДНК [So S., 2009]. Платформой для связывания ATM с участками поврежденной ДНК является комплекс MRN (MRE11, Rad50, Nbs1) [Lee J.H., 2005]. Nbs1 в составе MRN комплекса взаимодействует с MDC1 и таким образом обеспечивает связь с ATM. Способность MDC1 связываться как с γH2AX, так и с ATM позволяет «нацеливать» ATM на нуклеосомы, содержащие H2AX, обеспечивая распознавание участка хроматина, прилежащего к ДР ДНК и распространение фосфорилирования γH2AX [Marechal A., 2013]. ATM также является центральной киназой, фосфорилирующей ключевые белки (Chk1, Chk2, Rad17, NBS1, BRCA1, BLM, SMC1, 53BP1, MDC1, p53, MDM2 и т.д.) вовлеченные в формирование клеточного ответа на воздействие ионизирующего излучения: задержка клеточного цикла, репарация, клеточная гибель, индукция клеточного старения [Lee J.H., 2007].

Репарация ДР ДНК включает канонический путь негомологичного соединения концов (англ. c-NHEJ, далее НГСК), альтернативный путь негомологичного соединения концов (англ. alt-NHEJ, далее альт-НГСК) и гомологическую рекомбинацию (англ. HR, далее ГР) и (Рис. 1.4).

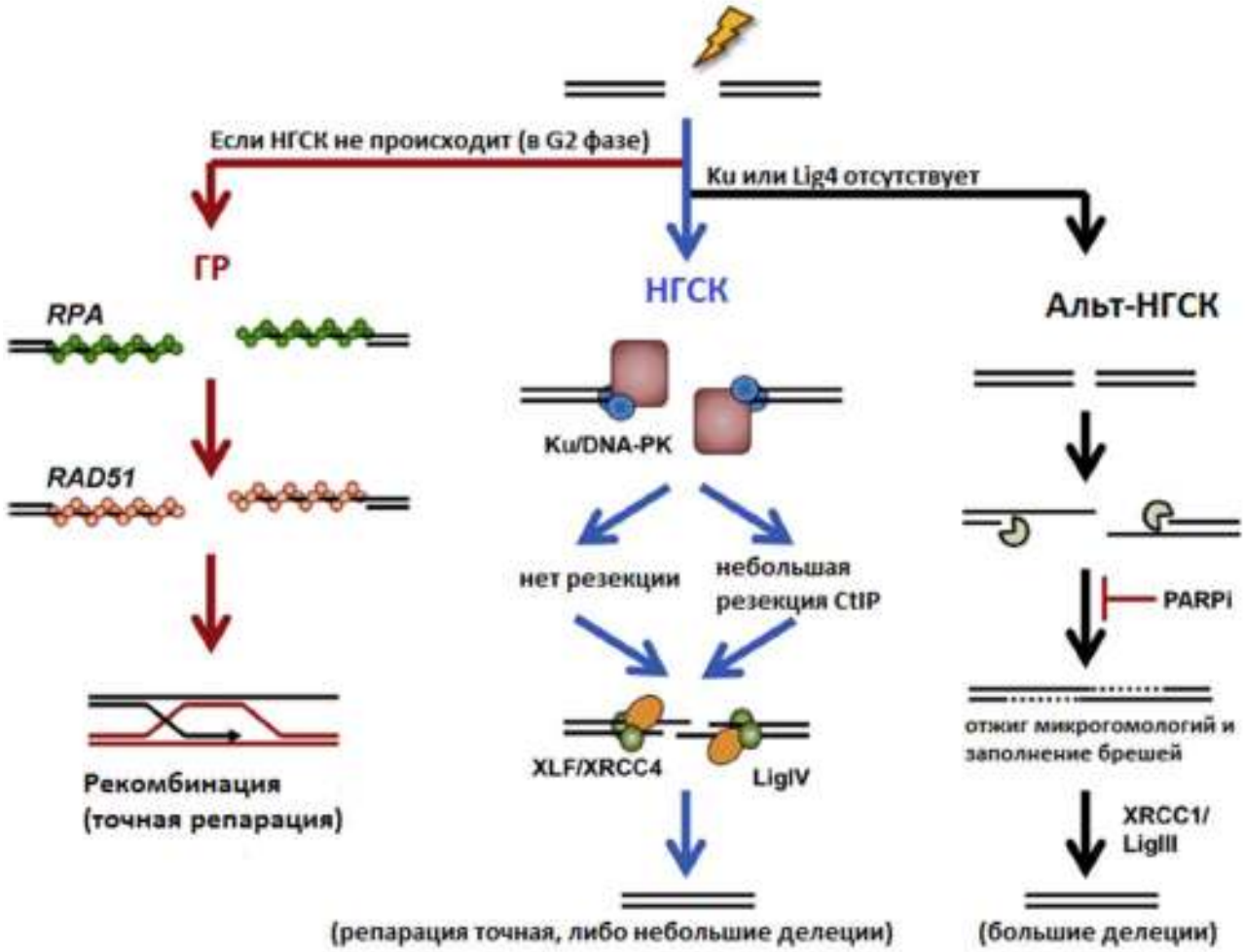


**Рисунок 1.4** Основные пути репарации двунитевых разрывов ДНК

НГСК является механизмом репарации ДР ДНК, при котором поврежденные концы соединяются напрямую и не требуют гомологичной хромосомы в качестве матрицы. Из-за процессинга нитей ДНК и последующего их сшивания во время НГСК образуются микроделеции, которые в последующем могут приводить к мутациям. НГСК осуществляет репарацию до 80% ДР ДНК, образовавшихся в результате воздействия редкоионизирующего излучения, и может осуществляться на любой стадии клеточного цикла [Kakarougkas A., 2014]. В зависимости от конфигурации концов поврежденной ДНК репарация может осуществляться по классическому, либо по альтернативному пути НГСК [Chang H.H.Y., 2017].

В классическом пути НГСК начинается с быстрого и эффективного присоединения гетеродимера Ku70/80 к концам поврежденной ДНК, что стабилизирует их, защищает от действия экзонуклеаз и служит сигналом для автофосфорилирования и активации ключевой киназы семейства ФИСК-АТМ. Связанный с ДНК гетеродимер Ku70/80 присоединяет каталитическую субъединицу ДНК протеинкиназы (DNA-PKcs), таким образом формируя комплекс DNA-PK [Gottlieb T.M., 1993]. Два комплекса DNA-PKcs удерживают концы ДНК на близком расстоянии [Spagnolo L., 2006]. DNA-PKcs активируется путем аутофосфорилирования, а также активизирует основные компоненты НГСК: нуклеазу Artemis, участвующую в направлении от 5′ к 3′ резекции нитей ДНК, формирование лигирующего комплекса, состоящего из ДНК лигазы IV, а также белков XRCC4 и XLF [Cottarel J., 2013]. Таким образом, НГСК является компактно-локализованным в пространстве вокруг ДР процессом с быстрой кинетикой и характерными временами порядка 30-40 минут для простых и 3-4 часов для репарации сложных ДР.

Альтернативный путь НГСК возникает в том случае, когда репарация по классическому НГСК не может осуществляться в связи с отсутствием белков Ku или лигазы IV [Mladenov E., 2016]. Одним из первых белков, вовлеченных в альт-НГСК, является PARP-1. PARP-1 обладает способностью связываться с концами поврежденной ДНК, а также может оказывать неэффективную конкуренцию Ku, таким образом, переключая репарацию с классического пути НГСК на альтернативный [Wang M., 2006]. В заключительной стадии лигирования альт-НГСК участвуют ДНК лигаза I, лигаза III и XRCC1 [Soni A., 2014]. Ключевым отличием альт-НГСК от классического НГСК является резекция концов ДНК с участием CtIP и использование микрогомологичных последовательностей, состоящих из 5-25 пар оснований. Несмотря на то, что в результате ДР ДНК устраняются из генома, альт-НГСК приводит к серьезным хромосомным аберрациям, таким как делеции, транслокации, инверсии и другие сложные перестройки. Более

того, в некоторых видах опухолей наблюдается повышенная регуляция альт-НГСК (и соответственно пониженная регуляция классического НГСК) [Tobin L.A., 2013]. Альт-НГСК является более медленным путем репарации, чем классический путь НГСК. Он может осуществляться на всех стадиях клеточного цикла, однако, наибольшая активность наблюдается в S/G2 фазах. Вероятно, это связано с тем, что ферменты, участвующие в резекции поврежденных концов ДНК, наиболее активны в S/G2 фазах [Mladenov E., 2013].

В отличие от НГСК ГР может осуществляться только в присутствии гомологичной сестринской хроматиды, поэтому данный механизм репарации осуществляется во время S/G2 фазы клеточного цикла. Репарации путем ГР начинается с резекции свободных 5` концов ДНК по краям разрыва в направлении от 5` к 3` с образованием однонитевых участков (липких концов) [Symington L.S., 2011]. Первый этап резекции -инициация- происходит с участием белка CtIP и MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) комплекса, в результате чего происходит удлинение липких концов ДНК. На следующем этапе репликативный белок А (РБА) мгновенно связывается с длинными однонитевыми участками ДНК, препятствуя образованию вторичных структур. В дальнейшем РБА последовательно замещается Rad51 при участии белка BRCA2 [Pellegrini L., 2002]. Связывание Rad51 с ДНК запускает внедрение цепи в неповрежденную сестринскую хроматиду с образованием D-петли и гетеродуплекса с образованием структуры Холлидея. В конечном итоге происходит замена и синтез участка поврежденной хроматиды, содержащего ДР, на основе неповрежденной последовательности сестринской хроматиды, используемой в качестве матрицы, а затем – лигирование концов ДНК. ГР завершается разрушением структуры Холлидея, в процессе которого может произойти (а может и не произойти) обмен гомологичными участками сестринских хроматид [Iliakis G., 2009]. Таким образом, репарация по пути ГР идет довольно медленно, в то же время этот путь репарации ДНК более точный.

Если репарация ДР ДНК невозможна, то такие киназы, как ATM и ATR активируют в клетке сигнальные пути, приводящие к программируемой клеточной гибели путем апоптоза [Roos W.P., 2013] и аутофагии, либо к преждевременному старению [Манских В.Н., 2007]. В некоторых случаях неспособность определить или устранить ДР ДНК может приводить к тому, что поврежденные клетки могут проходить сверочные точки клеточного цикла и, соответственно, избегать гибели. Такие клетки могут потенциально образовывать потомство, которое несет мутации и хромосомные аберрации [Bohgaki T., 2010].

## *1.4 Особенности воздействия ионизирующего излучения в малых дозах на мезенхимальные стволовые клетки*

### *1.4.1 Репарация двунитевых разрывов ДНК*

Кинетика образования и деградации фокусов γH2AX, после воздействия ИИ была изучена достаточно подробно [Грехова А.К., 2015; Pustovalova M., 2016]. Многочисленные исследования привели к выводу о том, что существует два типа фокусов γH2AX. Первый тип - это переходные фокусы, связанные с быстрым распознаванием ДР ДНК и процессом дефосфорилирования γH2AX до H2AX, что обычно занимает от нескольких минут до часов. Второй тип- это длительно персистирующие или остаточные фокусы [Pustovalova M., 2017]. Они могут присутствовать в течение дней-месяцев после образования ДР. Остаточные фокусы γH2AX могут представлять собой как ДР ДНК, подвергающиеся медленному процессу репарации, так и свидетельствовать о нерепарируемых повреждениях, которые могут вызывать клеточную гибель и старение [Siddiqui M.S., 2015]. Существуют экспериментальные доказательства, что фокусы γH2AX способны передаваться следующей клеточной генерации (проходить через митоз) и служить своеобразным индикатором накопления генетических нарушений [Vaurijoux A., 2017].

В 2003 г. Розкамм и Лобрич на основании изучения кинетики фокусов γH2AX показали, что ДР, индуцированные в культурах непролиферирующих фибробластов человека рентгеновским излучением в очень малых дозах (~1 мГр), остаются нерепарируемыми в течение нескольких дней, в отличие от эффективной репарации ДР ДНК, наблюдаемой при облучении в более высоких дозах в тех же клетках [Rothkamm K., 2003]. Полагают, что данный феномен обусловлен неэффективной репарацией ДР ДНК, индуцированных облучением в малых дозах [Sugihara T., 2012] и индуцибельным характером репарации ДР ДНК [Grudzenski S., 2010], когда репарация ДР ДНК запускается только после достижения определенного порогового количества повреждений ДНК в геноме.

Существует мнение, что клетки млекопитающих не могут обеспечивать эффективную репарацию ДР ДНК, индуцируемых малыми дозами ИИ, в связи с отсутствием индукции G2/M чекпоинт-ареста и наличием ограничений доступа компонентов систем репарации ДР к участкам ДНК в составе хроматина [Газиев А.И., 2011]. Это означает, что G2/M чекпоинт-арест не поддерживает репарацию ДР, когда их количество менее чем 10-20 на клетку. ДР ДНК гетерохроматина сохраняются в течение длительного времени после облучения в связи с необходимостью его "вскрытия" для доступа компонентов систем репарации к поврежденным участкам ДНК. При малых дозах ИИ гетерохроматин еще меньше релаксируется, и доступ ферментов репарации к повреждениям ДНК более ограничен. Таким образом, присутствие длительно-персистирующих фокусов γH2AX также может быть результатом присутствия ДР ДНК в участках гетерохроматина, где репарация осуществляется медленнее. Чем плотнее упаковка хроматина, тем большей реорганизации он должен подвергаться в процессе репарации, и эти процессы могут оказаться необратимыми. То есть, данные фокусы могут также свидетельствовать о реорганизации структуры хроматина. Таким образом, наследуемые персистирующие фокусы могут отражать

эпигенетичекие изменения в структуре хроматина потомства облученных клеток [Costes S.V., 2010].

Для МСК, облученных ИИ в малых дозах, также характерно длительное присутствие фокусов γH2AX [Osipov A.N., 2015], что может свидетельствовать о неэффективности репарации ДР ДНК [Alessio N., 2015]. В то же время ядерная организация МСК глобально более открыта и благоприятна для экспрессии генов и только с дифференциацией становится более компактной в различных областях генома. Открытая конформация позволяет белкам легко взаимодействовать с хроматином, что облегчает процесс остановки клеточного цикла и репарацию ДНК в поврежденных клетках [Harfouche G., 2010]. В данном случае длительное присутствие ДР ДНК в облученных малыми дозами МСК можно объяснить их образованием *de novo* в результате ошибок репликации на фоне характерной для малых доз стимуляции клеточной пролиферации.

Так, полимеразный комплекс, натыкаясь на повреждение ДНК (брешь, образовавшаяся в результате эксцизионной репарации, межнитевые сшивки) останавливается, в то время как хеликаза продолжает раскручивать родительскую цепь ДНК, приводя к формированию длинных одноцепочечных нитей. Эта одноцепочечная ДНК связывается с РБА и служит сигналом для связывания белков, участвующих в реакции на репликативный стресс. Одним из таких белков является ATR. ATR фосфорилирует субстраты, необходимые для завершения репликации, а также фосфорилирует γH2AX. В самом деле, ATR, активирующаяся в результате остановки вилки репликации, может осуществлять фосфорилирование γH2AX на больших участках хроматина в отсутствие ДР ДНК [Sirbu B.M., 2011]. Похожим образом происходит фосфорилирование γH2AX в результате образования спонтанных ДР ДНК в клетках, не подвергавшихся облучению, под влиянием образующихся в процессе клеточного метаболизма АФК, ошибок репликации и рекомбинации, а также спонтанных химических модификаций. Активация ATR необходима для

стабилизации и перезапуска вилки репликации [Zeman M.K., 2014; Dickey J.S., 2011]. В случае если не удается стабилизировать вилку в течение 1-2 ч, происходит ее коллапс [Cortez D., 2015]. Это достаточно редкое событие происходит в отсутствие ATR-зависимой сверочной точки репликации и приводит к образованию ДР ДНК. Известно, что повреждения ДНК, образующиеся в результате остановки и коллапса репликативной вилки, репарируются путем медленного, но более корректного механизма гомологической рекомбинации [Gelot C., 2015] и поэтому, в целом, представляют меньшую опасность для дальнейшей судьбы клетки, по сравнению с радиационно-индуцированными ДР [Saleh-Gohari N., 2005].

Однако при оценке репарации ДР ДНК важно понимать, что исчезновение фокусов γH2AX, т.е их дефосфорилирование с помощью фосфатазы 2A свидетельствует лишь о процессе лигирования ДР ДНК, но никак не оценивает его роль в дальнейшей судьбе клетки. Поскольку около 80% радиационно-индуцированных ДР ДНК репарируются путем НГСК [Kakarougkas A., 2014], который может приводить к потере генетической информации, необходимы целенаправленные исследования проявлений отдаленных эффектов в потомстве облученных ИИ в малых дозах клеток.

Стоит упомянуть, что при использовании первичной культуры клеток в качестве экспериментальной модели большое значение имеет номер клеточного пассажа, на котором было произведено облучение. Многочисленные исследования показали, что длительное культивирование МСК приводит к возникновению связанных со старением изменений [Pustovalova M., 2016], снижению клеточных функций, снижению регуляции генов, участвующих в пролиферации, ухудшению фокальной адгезии, дисфункции митохондрий, а также увеличению количества ДР ДНК [Geissler S., 2012]. Накопление ДР ДНК может свидетельствовать о генетической нестабильности и приводить к снижению дифференцировочного потенциала МСК [Alves H., 2010]. Также МСК на ранних пассажах более устойчивы к воздействию ИИ и ДНК-повреждающих факторов, чем на поздних пассажах.

На ранних пассажах процесс репарации ДР ДНК в МСК осуществляется более эффективно. Он является ATM-зависимым и связан с повышенными уровнями PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1)- фермента, участвующего в репарации повреждений ДНК и ремоделировании хроматина за счет поли-АДФ-рибозилирования гистонов [Wu P.K., 2017]. В то же время, облученные ИИ МСК на ранних пассажах обладают более эффективной остановкой клеточного цикла в G2/M фазе, где, как известно, вступает в силу репарация ДР ДНК по пути ГР. Учитывая, что МСК, облученные на поздних пассажах, пребывают в фазе G0/G1, репарация по подверженному ошибкам пути НГСК является основным путем для МСК на поздних пассажах и может приводить к еще большим генетическим изменениям. Снижение способности МСК репарировать ДР ДНК на поздних пассажах одновременно с нарушением клеточного цикла связано с накопленными со временем повреждениями ДНК, вследствие их некорректной репарации [Moehrle B.M., 2016]. Со временем они приводят к мутациям, снижению клеточных функций, старению и увеличению риска злокачественной трансформации.

Основные типы реакций стволовых клеток на воздействие ИИ представлены на рисунке 1.5.

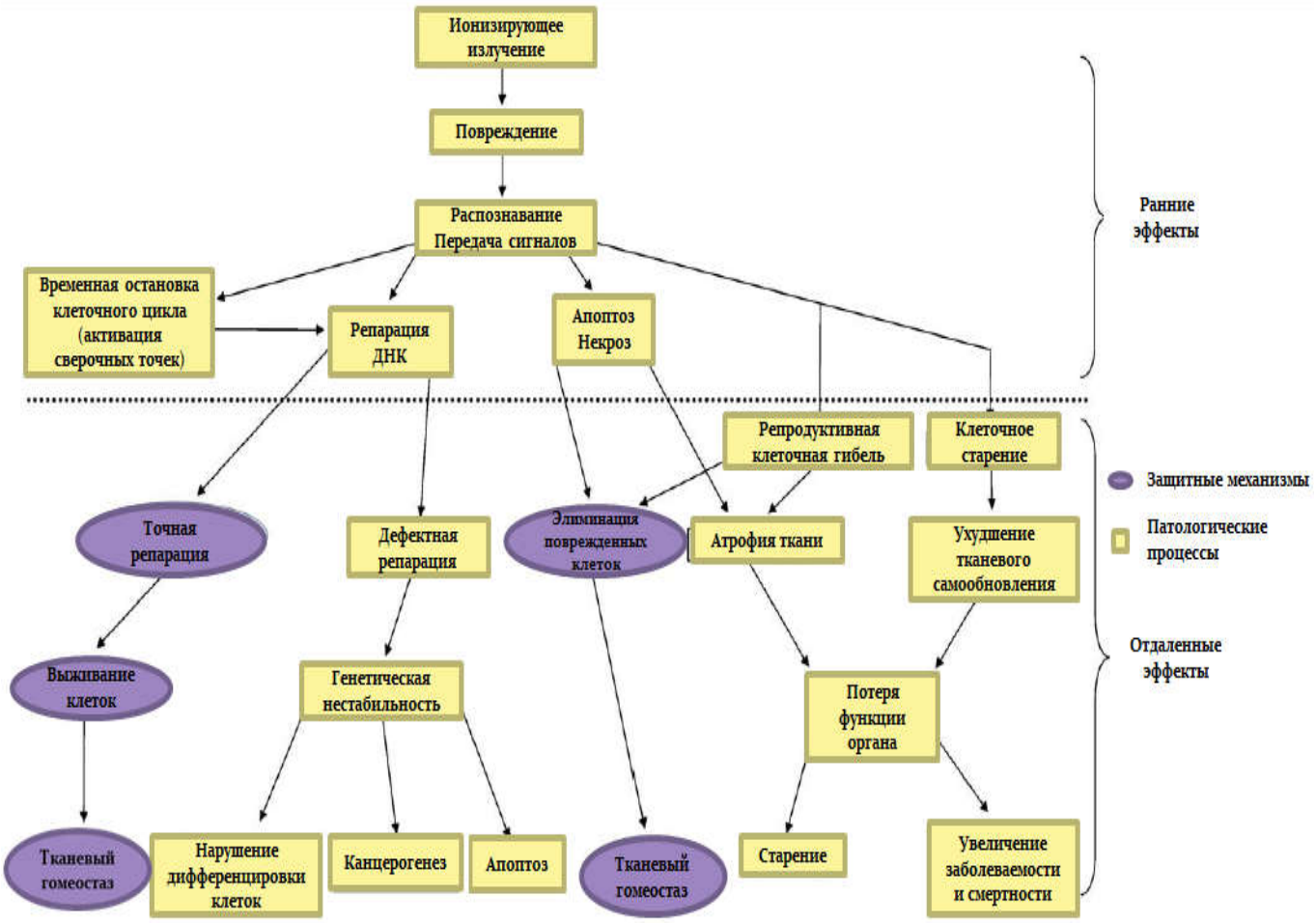


**Рисунок 1.5** Реакция стволовых клеток на воздействие ионизирующего излучения [Abreu S.C., 2016].

Клетки развили систему реакции на повреждение ДНК, которая запускается во время распознавания повреждения, вызывая остановку клеточного цикла, репарацию или элиминацию поврежденных клеток. На данном рисунке различные типы реакции клеток, включая защитные механизмы и патологические процессы, были сгруппированы в соответствии с их ранним или поздним проявлением. Последствия радиационного облучения с точки зрения канцерогенеза, старения и заболеваемости более важны для стволовых клеток, чем для дифференцированных, поскольку они

являются своеобразным долгосрочным резервуаром для регенерации поврежденных тканей [Harfouche G., 2010].

*1.4.2 Пролиферация*

Стимулирующее действие малых доз на пролиферацию было описано для множества типов клеток [Liang X., 2016], в том числе для МСК. В исследовании Лян с соавт. было показано стимулирующее действие ИИ в малых дозах на клеточную пролиферацию костного мозга крыс в результате активации MAPK/ERK сигнальных путей [Liang X., 2011]. Облучение в дозе 75 мГр вызывало значительное увеличение доли клеток в S фазе через 2-6 ч после облучения. В дальнейшем это нашло подтверждение в работах Ян с соавт. [Yang L., 2017], где облучение в той же дозе (75 мГр) вызывало стимуляцию пролиферации МСК костного мозга человека, а также увеличение доли клеток в S-фазе одновременно с секрецией SCF (от англ. *stem-cell factor*) и IL-11 через 24 ч. Причем на 4-7 день после облучения в малых дозах пролиферация клеток была значительно выше, чем у необлученных. Основные механизмы стимулирующего воздействия ИИ в малых дозах на пролиферацию МСК костного мозга, по мнению авторов, опосредуются белками и молекулами, связанными с остановкой клеточного цикла, такими как Rb, cyclin E, CDK1 и CDC25B. Стимулирующим действием ИИ в малых дозах на пролиферацию МСК костного мозга можно объяснить ускоренное заживление ран на коже крыс, больных диабетом. Это явление сопровождалось увеличением количества клеток костного мозга и циркулирующих МСК (обладающих CD31(+) маркерами стволовости и CD34(+) эндотелиальными маркерами), регенерации сосудов, клеточной пролиферации в поврежденной ткани, а также экспрессии матриксных металлопротеиназ 2 и 9 [Guo W.Y., 2010]. На 7-е сут после облучения в дозах 10–100 мГр обнаружено статистически значимое увеличение количества МСК головного мозга мышей линии C57BL/6 на 30–40% по сравнению с контролем. При облучении нейральных стволовых клеток (НСК) число

клеток возрастало на 15–20% при воздействии в дозах 10– 50 мГр, что также свидетельствует о стимуляции пролиферации НСК при действии малых доз. В то же время существенных изменений в количестве МСК костного мозга не наблюдалось [Посыпанова Г.А., 2016 ].

В работе Фуйиширо с соавт. наблюдалось незначительное снижение экспансии МСК костного мозга после воздействия γ-излучения в дозе 100 мГр, а затем ее последующее восстановление до контрольного уровня через 14 дней после облучения [Fujishiro A., 2017]. Показано, что данная доза облучения незначительно влияет на способность МСК к дифференцировке. Более того, через 3 недели после воздействия γ-излучения характеристики облученных МСК (уровень экспрессии IL-6, SCF и Flt3L) соответствовали таковым для необлученных клеток. В то же время в работе Алессио с соавт. наблюдалось снижение клеточной пролиферации и доли клеток в S фазе через 48 ч после воздействия ИИ в дозе 40 мГр [Alessio N., 2015].

Таким образом, оценка влияния малых доз на изменение клеточной пролиферации МСК противоречива и требует дальнейшего изучения. Необходимо заметить, что клеточный пассаж также играет роль при оценке пролиферации после облучения. На ранних пассажах МСК обладают лучшей колониеобразующей способностью, нежели на поздних пассажах. При длительном культивировании in vitro МСК костного мозга человека наблюдается постепенное снижение пролиферативной активности клеток. Так, МСК 3— 4-го пассажей обладают значительно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с культурами 10—12-го пассажей, в которых кратность прироста клеток может составить 5,88 и 2,03 раза соответственно [Осипова Е.Ю. , 2009].

### *1.4.3 Старение*

Клеточное старение возникает в культуре *in vivo* в ответ на значительный внутриклеточный и внеклеточный стресс (укорачивание теломер, дисфункция митохондрий, оксидативный стресс, генотоксический

стресс, экспрессия онкогенов). Важным признаком старения является неспособность клетки вступать в клеточный цикл [Hayflick L., 1965]. В стареющих клетках наблюдается остановка клеточного цикла в $G_1$ фазе и, несмотря на все необходимые ростовые условия, клетка неспособна осуществлять репликацию ДНК. Таким образом, программа старения препятствует передаче повреждений последующим поколениям, предотвращает опухолевую трансформацию клеток и способствует удалению таких клеток иммунной системой организма. Тем не менее, если образование стареющих клеток превосходит их удаление иммунной системой или если иммунная система не способна эффективно удалять стареющие клетки, как это происходит в результате воздействия ИИ, то они способны накапливаться в тканях [Wang Y., 2016].

Клетки, подвергающиеся старению, характеризуются рядом особенностей: остановкой клеточного цикла, изменением морфологии и организации хроматина, изменением экспрессии генов, повышением активности ассоциированной со старением *β-галактозидазы* (СА-*β-галактозидазы*) в цитоплазме и др. [Dimri G.P., 1995]. В то время как индукция процессов клеточного старения, вызванная лучевой и химиотерапией, направлена на быстрое подавление пролиферации опухолевых клеток, сам процесс клеточного старения является достаточно продолжительным во времени. Он сопровождается секрецией множества факторов (противоспалительных цитокинов, хемокинов, факторов роста, протеаз, нерастворимых белков/компонентов внеклеточного матрикса), которые объединены общим названием «секреторный фенотип, ассоциированный со старением» (от англ. senescence-associated secretory phenotype (SASP)) [Coppe J.P., 2008]. Через секрецию данных факторов стареющие клетки способны активировать различные рецепторы на клеточной поверхности и соответствующие пути передачи сигнала, воздействовать на процессы пролиферации, дифференцировки и выживания соседних клеток. В результате вокруг стареющих клеток может создаваться

микроокружение благоприятное для роста и размножения клеток со злокачественным фенотипом. Таким образом, несмотря на то, что клеточное старение является механизмом, подавляющим риск злокачественной трансформации поврежденных клеток, секреторная активность стареющих клеток также может изменять тканевое микроокружение и способствовать развитию опухоли [Coppe J.P., 2010].

В недавнем исследовании Студенцка и соавт. показано, что облучение культур фибробластов человека γ-излучением приводит к образованию популяции клеток, обладающих одновременно признаками старения и апоптоза, так называемого сеноптоза (англ. «senoptosis») [Studencka M., 2017]. Воздействие γ-излучения в дозе 10 Гр приводило к образованию устойчивой суб-G1 популяции стареющих клеток, которые, тем не менее, не обладали SASP. В то же время высвобождение митохондриальной эндонуклеазы G в этих клетках вызывало нелетальное расщепление поврежденной ДНК, таким образом свидетельствуя о проявлении апоптоза. Однако это не приводило к увеличению клеточной гибели. Возможно, явление сеноптоза характерно только для действия больших доз ИИ, поскольку действие эндонуклеазы G скорее обусловлено ускоренной репарацией большого количества ДР ДНК и ведет к необратимой остановке клеточного цикла.

В исследовании Алессио с соавт. облучение МСК в дозе 40 мГр приводило к снижению аутофагии и индукции клеточного старения через 6-48 часов после облучения. [Alessio N., 2015]. Снижение уровня аутофагии в облученных МСК также может являться вкладом в увеличение клеточного старения, поскольку эти два механизма тесно связаны между собой и используются клеткой для защиты от стрессового воздействия [Gewirtz D.A., 2013]. Не наблюдалось увеличения клеточной гибели и в работе Хофиг и соавт. после облучения МСК костного мозга мышей в дозе 100 мГр. Разница между количеством $\beta$-галактозидаза-позитивных клеток в контрольной и

облученной группах через 7 дней после облучения составила ~10% [Hofig I., 2016].

Облучение МСК в дозе 40 мГр также приводит к изменению клеточного метаболизма и снижению способности использовать жирные кислоты и глутамин в качестве источника энергии. Снижение протеасомной активности, т.е. способности расщеплять поврежденные внутриклеточные белки с помощью треониновых протеаз, тоже было характерно для этих клеток [Capasso S., 2015]. В МСК, облученных в дозе 100 мГр в первые 24 ч после облучения наблюдался повышенный уровень секреции IL6 [Fujishiro A., 2017], что также может свидетельствовать об индукции клеточного старения. Однако, данное явление наблюдалось только в двух из пяти исследуемых образцов и через 3 недели после воздействия уровень IL6 практически не отличался от контроля. Возможно, что различия в реакции клеток на облучение связаны с различной чувствительностью к воздействию ИИ.

Продолжительность жизни МСК человека in vitro составляет ~ 20-40 удвоений [Banfi A., 2000], после чего клетки вступают в репликативное старение. Но уже на поздних пассажах популяция может проявлять ассоциированный со старением фенотип и снижение пролиферации [Pustovalova M., 2017]. Пути опухолевой супрессии p53-Rb и p53-Rb2 играют важную роль в запуске клеточного старения, связывая распознавание повреждения ДНК и остановку клеточного цикла [Hwang E.S., 2014]. Ведущую роль в процессе клеточного старения играет накопление микроструктурных хромосомных нарушений, возникающих вследствие некорректной репарации ДР ДНК [Moehrle B.M., 2016]. Среди них важную роль в запуске программы клеточного старения играют ДР ДНК, образующиеся в теломерных последовательностях. Поскольку репарация ДР в теломерных последовательностях затруднена, они способны накапливаться со временем. Об этом свидетельствует длительное присутствие фокусов γH2AX в теломерной ДНК [Fumagalli M., 2012].

Активные формы кислорода (АФК), образующиеся в результате ассоциированной со старением дисфункции митохондрий вызывают еще больший уровень повреждения ДНК и образование оксидативных повреждений ДНК в теломерных последовательностях [von Zglinicki T., 2005]. Таким образом, продукция АФК в клетках увеличивается пропорционально длительности клеточного культивирования. Интересно, что МСК с высоким уровнем экспрессии каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) на поздних пассажах обладали значительно меньшим количеством повреждений ДНК по сравнению с контрольными клетками на тех же пассажах [Trachana V., 2017]. Что, вероятно, также свидетельствует о тесной связи внеклеточной продукции АФК с укорачиванием теломер при старении клеток.

### *1.4.4 Радиационно-индуцированная нестабильность генома*

Повреждение ДНК, присутствие повышенного уровня АФК, дисфункция митохондрий, повышенная секреция цитокинов и эпигенетические изменения могут приводить к радиационно-индуцированной нестабильности генома (РИНГ), вызывая, в конечном счете, канцерогенез [Morgan W.F., 2015]. РИНГ определяется как структурно-функциональное непостоянство генетического материала, возникающего в потомках многократно поделившихся клеток, подвергшихся воздействию радиации, проявляющегося повреждениями структуры ДНК, конформационными изменениями хроматина, аберрациями хромосом, сестринскими хроматидными обменами, анеуполиплоидиями, внеплановой экспрессией генов, генными и хромосомными мутациями, что приводит к нарушению геномного баланса и сопровождается развитием клеточной дисфункции, малигнизации или гибелью клеток [Рябченко Н.Н., 2014]. Одним из механизмов развития РИНГ в тканях является гиперпродукция АФК в ответ на стрессовое воздействие [Morgan W.F., 2013]. Так же в потомстве облученных клеток с РИНГ наблюдалась повышенная продукция

активных форм кислорода (АФК), образующихся в результате дисфункции митохондрий. АФК, в свою очередь, вызывают оксидативные повреждения ДНК и, как следствие, приводят к индукции клеточной гибели и образованию хромосомных аберраций [Kim G.J., 2006].

В результате подробного анализа литературных данных Котеровым А.Н. был сделан вывод, что обоснованные данные об индукции РИНГ при воздействии малых доз ИИ с низкой ЛПЭ для стабильных клеточных линий отсутствуют. А существующие экспериментальные данные касаются аномальных биологических объектов, характеризующихся высокой спонтанной нестабильностью, радиочувствительностью и мутабельностью. Причем некоторые исследованные линии клеток были злокачественными, а, следовательно, в большинстве своем нестабильными исходно [Котеров А.Н., 2009].

В экспериментах с нейральными стволовыми клетками протонное облучение в дозе 100 мГр приводило к повышенному уровню образования АФК в течение 48 ч после воздействия [Tseng B.P., 2013]. В свою очередь, повышенная продукция АФК, вызванная фракционированным воздействием малых доз ИИ способна приводить к активации AKT/cyclin D1 сигнального пути и, как следствие, нарушению репликации ДНК, образованию ДР, старению и генетической нестабильности облученных клеток [Shimura T., 2016]. Однако в культивируемых на протяжении 8 пассажей после облучения 80 мГр первичных МСК человека не наблюдалось таких эффектов проявления РИНГ, как увеличение количества повреждений ДНК [Pustovalova M., 2017]. Напротив, данные показатели практически не отличались от контрольных.

На проявление РИНГ также может оказывать влияние эффект свидетеля, заключающийся в передаче сигналов от облученных клеток к необлученным [Mothersill C., 2004]. Так, генотоксический стресс, вызванный секретируемыми МСК сигналами воспаления в мышиных моделях с синдромом Швахмана-Даймонда приводил к дисфункции митохондрий,

окислительному стрессу и реакции на повреждение ДНК в гематопоэтических стволовых и прогениторных клетках. Активация p53-S100A8/9-TLR пути воспаления в этих клетках свидетельствовала о развитии миелодиспластического синдрома, принципиального предшественника острого лейкоза [Zambetti N.A., 2016]. Секретируемые внеклеточные везикулы, выделенные из МСК костного мозга облученных мышей, были также ответственны за проявление радиационно-индуцированного эффекта свидетеля (РИЭС) в клетках селезенки и костного мозга мышей линии C57BL/6. Анализ уровня мРНК в секретируемых везикулах показал, что у мышей, облученных в дозе 100 мГр, уровень экспрессии 20 из 500 исследуемых мРНК отличался от контрольного уровня. Эти мРНК оказывали влияние на 33 различных метаболических пути, включающих репарацию ДНК, сигнальный путь TGFβ, сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток и др. [Szatmari T., 2017].

*1.4.5 Канцерогенез*

В последнее время появилось большое количество исследований, посвященных изучению возможного влияния облучения в малых дозах в результате проведения компьютерной томографии (КТ) у детей и подростков на риски возникновения злокачественных новообразований [Krille L., 2012; Gibson D.A., 2014]. В исследовании Пирс с соавт. была обнаружена дозо-зависимая корреляция между риском возникновения лейкемии и опухоли головного мозга и орган-специфичным воздействием ИИ (костный и головной мозг) во время проведения КТ у детей [Pearce M.S., 2012]. Данное исследование было подвергнуто сомнению, поскольку не исключена возможность, что на результаты повлияла обратная причинно-следственная связь, то есть процедура КТ была проведена для диагностики уже существующей болезни и, следовательно, не является ее причиной. При повторном исследовании, в котором были исключены индивидуумы с возможными признаками рака до прохождения процедуры, а время между

прохождением КТ и диагностикой рака составляло 2 года для лейкемии и 5 лет для опухоли головного мозга, снижение избыточного радиационного риска составило 15% для лейкемии и 30% для опухоли головного мозга [Berrington de Gonzalez A., 2016]. Авторы полагают, что полученные данные свидетельствуют о повышенном риске развития рака после облучения в малых дозах в результате прохождения молодыми пациентами КТ. С другой стороны, появились данные, напротив, свидетельствующие о положительных эффектах компьютерных томографий: уменьшение смертности от рака у людей [Ostrowski M., 2018] и экспериментальных животных [Lemon J.A., 2017; Lemon J.A., 2017]. Известно, что МСК способны мигрировать в «очаги» опухолей [Kidd S., 2009] и оказывать стимулирующий [Beckermann B.M., 2008] или ингибирующий эффект на опухолевый рост, инвазивность и метастазирование через прямые или непрямые взаимодействия с опухолевыми клетками [Nomoto-Kojima N., 2011]. Опухолевое микроокружение обладает молекулярными характеристиками «незаживающей раны», постоянно секретируя различные цитокины и другие медиаторы, которые устанавливают в ткани состояние воспаления [Feng H., 2018]. Эти сигналы обладают способностью притягивать различные типы клеток, в том числе МСК. Миграция и внедрение МСК в микроокружение первичных опухолей или метастазов наблюдалась для различных типов рака, в том числе рака легких [Loebinger M.R., 2009], рака головного мозга [Sasportas L.S., 2009], рака молочной железы [Patel S.A., 2010], рака толстой кишки [Menon L.G., 2007], рака поджелудочной железы [Zischek C., 2009] и др. Миграция стволовых клеток в места повреждения регулируется взаимодействием большого числа пар хемокин/рецептор, включая SCF/c-Kit [Sun L., 2004], VEGF/VEGFR [Schmidt N.O., 2009], HCP/c-Met [Garzotto D., 2008], SDF-1/CXCR4 [Carbajal K.S., 2010], молекул адгезии -интегрина-β1 и -β2, а также L-селектина [Son B.R., 2006]. Миграцию МСК также стимулируют такие воспалительные цитокины, ангиогенные факторы и факторы роста, как IL-8, нейротрофин-3, PDGF, EGF, TGF- β, IL-1 β и TNF-α

[Abarbanell A.M., 2009. Опухоли продуцируют и высвобождают большинство этих хемокинов и цитокинов, которые могут служить лигандами для связывания с рецепторомы МСК [Dwyer R.M., 2007]. При этом функции МСК в опухолевом микроокружении не являются однозначными. С одной стороны, являясь источником растворимых факторов, МСК могут быть вовлечены во многие процессы, связанные с осуществлением иммунного надзора, индукцией апоптоза и ангиогенеза. Так, в модели остеосаркомы мышей МСК человека способствовали росту и метастазированию опухоли как *in vivo*, так и *in vitro* [Xu W.T., 2009]. С другой стороны, показано, что МСК, выделенные из жировой ткани человека, ингибировали *in vitro* пролиферацию клеток рака молочной железы путем секреции DKK-1, который, в свою очередь, подавляет сигнальные пути Wnt/β-catenin и Nanog [Zhu Y., 2009]. При совместном культивировании клеток линии глиобластомы и МСК, полученных из пуповины человека, пролиферация клеток глиобластомы была значительно ингибирована, а цитотоксичность увеличена через подавление ингибитора апоптоза-XIAP (от англ. «X-linked inhibitor of apoptosis protein») [Dasari V.R., 2010 ].

В середине 90-х годов большое количество исследований привело к возникновению концепции опухолевых стволовых клеток (ОСК) [Lapidot T., 1994; Sell S., 1994]. Данная концепция предполагает, что нормальные стволовые клетки могут быть трансформированы в опухолевые, а прогениторные стволовые клетки могут быть трансформированы в ОСК. В свою очередь, ОСК способны образовывать клетки, составляющие основу опухоли [Manda K., 2014]. Данная концепция объясняет явление гетерогенности опухолевой ткани, а также признана приоритетной для многих исследований, в частности, в проблеме развития резистентности к лучевой и химиотерапии и рецидивирования новообразований. Так, присутствие ОСК в остеосаркомах может объяснить опухолевую гетерогенность, устойчивость к химиотерапии и высокую способность к метастазированию.

Существует множество предположений о том, что МСК являются предшественниками остеосарком. Фактически, остеобласт, который является единственной клеткой, способной продуцировать остеоидную матрицу, происходит от МСК. Кроме того, МСК способны дифференцироваться в хондроциты и фибробласты [Cleton-Jansen A.M., 2009; Basu-Roy U., 2013] в соответствии с различными подтипами остеосарком. Таким образом, некоторые исследователи предполагают, что остеосаркомы возникают на ранней стадии дифференциации МСК в остеобласты [Xiao W., 2013]. Недавно МСК человека были успешно трансформированы в опухолевые клетки в результате сайленсинга гена ретинобластомы (pRb, антионкоген, расположенный на 13q14,2) в сочетании со сверхэкспрессией c-Myc (онкоген, расположенный на 8q24.2) [Wang J.Y., 2017]. Интересен тот факт, что экспрессия SOX2 (маркер стволовости) была повышена в этих трансформированных МСК, аналогично первичной культуре клеток, выделенной из остеосаркомы, которая при пересадке индуцировала опухоли у иммунодефицитных мышей [Skoda J., 2016].

Сильный тропизм МСК костного мозга в отношении клеток остеосарком наблюдался в работе Пьетровито с соавт. [Pietrovito L., 2018], где после контакта с клетками остеосарком МСК костного мозга трансдифференцировались в ассоциированные с раком фибробласты, одновременно внося вклад в увеличение уровней секреции MCP-1, GRO-α, IL-6 и IL-8 в опухолевом микроокружении. Эти цитокины стимулируют мезенхимально-амебоидный переход (МАП), обусловленный активацией малой ГТФ-азы RhoA в клетках остеосарком. Результатом является значительное повышение агрессивности клеток остеосарком по таким показателям, как подвижность, инвазивность и трансэндотелиальная миграция. Обладая способностью к трансэндотелиальной миграции, клетки остеосарком, стимулированные МСК костного мозга, также стимулируют миграцию, инвазию и образование *in vitro* капиллярной сети эндотелиальных клеток. Таким образом, накопление МСК костного мозга в области опухолей

и последующий индуцированный цитокинами МАП являются критическими событиями в злокачественности остеосарком.

Важным в данном случае является вопрос: какую роль играет воздействие ИИ в трансформации стволовых клеток в ОСК и может ли она быть вызвана воздействием ИИ в малых дозах? К сожалению, существующие в настоящее время литературные данные затрагивают в основном влияние средних и больших доз ИИ (>100 мГр). Так, культивируемые в течение 6 месяцев после γ-облучения в дозе 2,5 Гр МСК формировали опухоли после трансплантации иммунодефицитным мышам. Также в этих клетках наблюдалось ускоренное укорачивание теломер и повышенный уровень анафазных мостиков [Christensen R., 2008].

Похожие результаты были получены в работе Москалевой [Москалева Е.Ю., 2017]. Опухоли были обнаружены у 2 из 5 мышей и у 5 из 5 мышей после трансплантации МСК костного мозга облученных в дозе 1 и 6 Гр соответственно. В последствии новообразования были охарактеризованы как многокомпонентные мезенхимомы («смесь сарком») [Москалева Е.Ю., 2017]. В то же время при подкожном введении облученных в дозе 100 мГр длительно-культивируемых МСК костного мозга и МСК головного мозга мышей линии C57BL/6, опухоли обнаружены не были. Это может быть связано со стимуляцией репарации спонтанных повреждений ДНК при этом воздействии, поскольку через 24 ч после облучения количество фокусов γH2AX, свидетельствующих о присутствии ДР ДНК в этих клетках, было ниже контрольного уровня [Москалёва Е.Ю., 2017]. Облучение 40 мГр первичной культуры МСК костного мозга с инактивированным геном *RB1* приводило к накоплению ДР ДНК в течение 48 ч после воздействия, при этом клетки не подвергались апоптозу или старению. Это свидетельствует о том, что данные клетки могут стать источником мутаций с последующей онкотрансформацией. Однако при анализе колониеобразования в мягком агаре данные клетки не проявляли свободный («безъякорный») рост, характерный для опухолевых клеток [Alessio N., 2017].

В недавнем исследовании Фенг с соавт. [Feng H., 2018] было показано, что облучение МСК костного мозга человека в дозе 10 Гр вызывало увеличение секреции TNF-α, IFN-γ, что приводило к ингибированию пролиферации и индукции апоптоза в клетках колоректального рака. Более того, облучение совместно культивируемых МСК костного мозга и клеток колоректального рака приводило к активации каспазы-3, снижению активности сигнального PI3K / AKT пути и внеклеточной киназы (ERK) в опухолевых клетках. Данные сигнальные пути могут способствовать гибели опухолевых клеток. Однако неизвестно, способны ли МСК проявлять аналогичные свойства после облучения в малых дозах (до 100 мГр).

Таким образом, вопрос о влиянии МСК на процессы стимуляции или подавления функций опухолевых клеток является неоднозначным. С одной стороны, МСК могут стимулировать рост и инвазивность опухолей. С другой стороны, они могут ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз опухолевых клеток и, возможно, вносить вклад в успешное проведение лучевой терапии.

Таким образом, обзор литературы показал, что вопрос об отклике МСК на воздействие ИИ в малых дозах является недостаточно изученным. Литературные данные довольно противоречивы. Это касается не только проявлений ранних эффектов, но и отдаленных последствий, возникающих в потомстве облученных клеток. В связи с этим, целью нашей работы являлось изучение отклика МСК человека на воздействие ИИ в малых дозах в ранние (до 24 ч) и отдаленные (до 11 пассажа) сроки после облучения.

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## *2.1 Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток слизистой десны*

Исследования были выполнены на культурах МСК, выделенных из биоптатов слизистой десны здоровых добровольцев (5 женщин 26-32 лет), подписавших информированное согласие на проведение экспериментов. Биоптат слизистой десны диаметром 2-3 мм измельчали при помощи одноразовых стерильных скальпелей. Полученный гомогенизат инкубировали в 1 мл 0,25% трипсин-ЭДТА (StemCell Technologies, США) при $37^0$С в течение 1 часа. От фермента избавлялись средой для промывания клеток (DMEM с низким содержанием глюкозы (StemCell Technologies, США) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль). Гомогенизат осаждали при 300g 7 минут. Полученную суспензию инкубировали в 1 мл 0,15% раствора коллагеназы II типа (Sigma, США) при $37^0$С в течение 2 часов. От фермента избавлялись 10 мл среды для промывания, гомогенизат осаждали при 300g 7 минут. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мл рабочей среды MesenCult (StemCell Technology, США). Подсчет и оценку жизнеспособности клеток проводили на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen,США). Количество клеток, выделенных из биоптатов десны, составило $7{,}88x10^6 \pm 0{,}4x10^6$. После подсчета клетки высаживали в культуральные вентилируемые флаконы с площадью дна 25 $см^2$ (Corning, США) в концентрации $0{,}3x10^6$ на флакон в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Stem Cell, США) с добавлением L-глютамина, антибиотиков (пенициллин, стрептомицин), 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Stem Cell, США). Культивирование МСК проводили в инкубаторе при температуре 37°С в условиях абсолютной влажности и 5% $CO_2$ в воздухе. Клетки культивировали до 3 пассажа, со сменой среды один раз в три дня. Затем пассировали каждые 7 дней. При достижении 75-80% монослоя, клеточную культуру снимали с пластика при помощи 0,05% раствора трипсина-ЭДТА (StemCell Technologies, США). От

фермента избавлялись средой для промывания клеток и осаждали при 300g 7 минут. Осадок ресуспендировали в рабочей среде, после чего производили подсчет количества жизнеспособных клеток. Клетки пассировали на стерильные покровные стекла в чашках Петри (d=33 мм. Corning, США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета $5x10^3$ кл/$см^2$. Для адгезии клеток на стеклах, рабочую среду (1,5 мл) добавляли через 15 минут. Инкубация перед облучением проводилась в стандартных условиях (37°C, 5% $CO_2$) в течение 20 часов.

### *2.2 Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга*

МСК костного мозга были получены от здорового добровольца (мужчина, 37 лет), подписавшего информированное согласие на проведение экспериментов. Аспират костного мозга, полученный в результате стернальной пункции, разбавляли в фосфатно-солевом буфере (PBS, Life Technologies, Gibco®, США), после чего выделяли мононуклеарные клетки путем центрифугирования в градиенте фиколла-урографина Ficoll-Paque (lympholyte®, Cedarlane, Канада). Затем клетки промывали в PBS и культивировали в базовой среде для МСК человека MesenCultTM MSC Basal Medium with supplement (StemCellTM Technologies, Канада) с добавлением 1% антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) (Sigma-Aldrich, США).

МСК костного мозга высаживались в культуральные вентилируемые флаконы с площадью дна 25 $см^2$ (Corning, США) в концентрации $0,3x10^6$ на флакон. Культивирование МСК костного мозга проводили в стандартных условиях $CO_2$-инкубатора (37°C, 5% $CO_2$, абсолютная влажность). Клетки пассировали каждые 7 дней. При достижении 75-80% монослоя, клеточную культуру снимали с пластика при помощи 0,05% раствора трипсина-ЭДТА (StemCell Technologies, США). От фермента избавлялись средой для промывания клеток и осаждали при 300g 7 минут. Осадок ресуспендировали в рабочей среде, после чего производили подсчет количества

жизнеспособных клеток. Клетки пассировали на стерильные покровные стекла в чашках Петри (d=33 мм. Corning, США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета $5x10^3$ кл/см$^2$. Для адгезии клеток на стеклах, рабочую среду (1,5 мл) добавляли через 15 минут. Инкубация перед облучением проводилась в стандартных условиях (37 °С, 5% CO2) в течение 20 часов.

### *2.3 Иммунофенотипическая характеристика выделенных мезенхимальных стволовых клеток*

Для иммунофенотипической характеристики клеток проводили анализ поверхностных маркеров клеток на проточном цитометре BD FACS Canto II (США).) с использованием следующей панели антител: CD3, CD13, CD14, CD19, CD 178 CD25, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 и HLA-DR (BD Bioscience, США). При исследовании иммунологической принадлежности МСК наблюдалась высокая экспрессия (>60%) маркеров: CD90, CD105, CD166, CD44, CD73, промежуточная (30-60%): CD13, CD29 и CD69 и отсутствие экспрессии маркеров: CD45, CD34, CD133, CD3, CD19, CD25, CD38, CD45, CD106, CD31 (<5% положительных клеток). Описанный фенотип полностью соответствовал мультипотентным мезенхимальным стромальным клеткам и не менялся в процессе культивирования.

### *2.4 Облучение*

Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 40 мГр/мин, напряжении 100 кВ, токе 0,8 мА, фильтре 1,5 мм Al, и температуре 4˚С (для охлаждения использовались термогранулы LAB ARMOR BEADS). Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15 %. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях $CO_2$ инкубатора (37°С, 5% $CO_2$).

### *2.5 Иммуноцитохимические исследования*

Клетки на покровных стеклах фиксировали параформальдегидом (4 % в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Пермеабилизировали 0,3 % Тритон-X100 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 2 % бычьего сывороточного альбумина для блокирования неспецифического связывания. Слайды инкубировали с первичными антителами (кроличьи моноклональные антитела к белку γH2AX (Merck-Millipore, США) в разведении 1/200, мышиные моноклональные антитела к фосфорилированному белку ATM (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400, мышиные моноклональные антитела к белку Ki67 (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем слайды промывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с вторичными антителами IgG (H+L), конъюгированными с флуорохромами (антитела козы к белкам мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Life Technologies, США), в разведении 1/600 и антитела козы к белкам кролика, конъюгированные с Rhodamine (Merck-Millipore, США), в разведении 1/400) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммунноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) и 60x объективом, с использованием наборов светофильтров возбуждения/эмиссии (UV-2E/C: 340-380 нм/435-485 нм, B-2E/C: 465-495

нм/515-555 нм и Y-2E/C: 540-580 нм/ 600-660 нм). Анализировали не менее 200 клеток на точку. Количество фокусов подсчитывали вручную.

### *2.6 Анализ количества β- галактозидаза положительных клеток*

Подсчет количества β-галактозидаза положительных клеток был проведен с использованием коммерческого набора для оценки клеточного старения «Cellular Senescence Assay Kit» (EMD Millipore, США). Клетки были окрашены в соответствии с протоколом производителя: из чашек Петри отбирали питательную среду и промывали 2 мл 1x PBS. Затем добавляли по 1 мл фиксирующего раствора на чашку и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Дважды промывали 2 мл 1x PBS. Добавляли 2 мл свежеприготовленного раствора для определения SA-β-gal. Инкубировали 4 ч с защитой от света при 37℃, в отсутствии $CO_2$. Затем удаляли раствор для определения SA-β-gal и дважды промывали чашки 2 мл 1x PBS. Присутствие фермента β-галактозидаза в клетках определяется по характерному окрашиванию цитоплазмы в зеленый цвет. На конечном этапе окраски мы использовали небольшую модификацию: клеточные ядра были окрашены 1 мкг/мл Hoechst 33342 (Molecular Probes, США). Такая модификация позволяет значительно улучшить подсчет β-галактозидаза негативных клеток.

Для длительного хранения окрашенных препаратов в чашки добавляли 70% глицерол, разбавленный 1x PBS. Окрашенные клетки визуализировались на инвертированном флуоресцентном микроскопе Olympus CKX 41 SF (Olympus, Япония), оснащенном камерой Infinity 3-1 (Lumenera Copr., Канада) CCD и 20x объективом с использованием фильтров возбуждения/эмиссии (CKX-U: 340-380нм/435-485 нм).

### *2.7 Статистический анализ*

Статистический и математический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0

(StatSoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов ± стандартная ошибка. Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## *3.1 Анализ накопления спонтанных двунитевых разрывов ДНК в длительно-культивируемых мезенхимальных стволовых клетках человека*

Как уже было упомянуто ранее, использование МСК в качестве экспериментальной модели требует подбора оптимального клеточного пассажа, поскольку наблюдаемые в результате радиационного воздействия в малых дозах эффекты могут быть вызваны не столько самим облучением, сколько быть обусловлены изменениями, происходящими в самих клетках в ответ на увеличение числа клеточных пассажей. Известно, что увеличение числа пассажей МСК может способствовать формированию хромосомных аберраций, клеточному старению, неспособности клеток к дифференцировке и злокачественной трансформации. В связи с этим мы считали необходимым провести анализ изменения числа фокусов γH2AX и pATM совместно с оценкой клеточной пролиферации в длительно культивируемых необлученных МСК десны (до 22 пассажа).

Результаты подсчета свидетельствует о том, что на 3-16 пассажах число фокусов/ядро статистически значимо не меняется ($r=0,66$; $p=0,11$), в то время как на поздних (18-22) пассажах отмечается резкое, почти двукратное, увеличение числа фокусов/ядро (рис. 3.1 А). В отличие от γH2AX, число фокусов pATM увеличивается практически монотонно с увеличением числа клеточных пассажей (рис. 3.1 А). Математически зависимость можно описать уравнением линейной регрессии $y=0,99 + 0,07*x$ ($r=0,83$; $p=0,003$), где y - число фокусов/ядро, а x - номер пассажа.

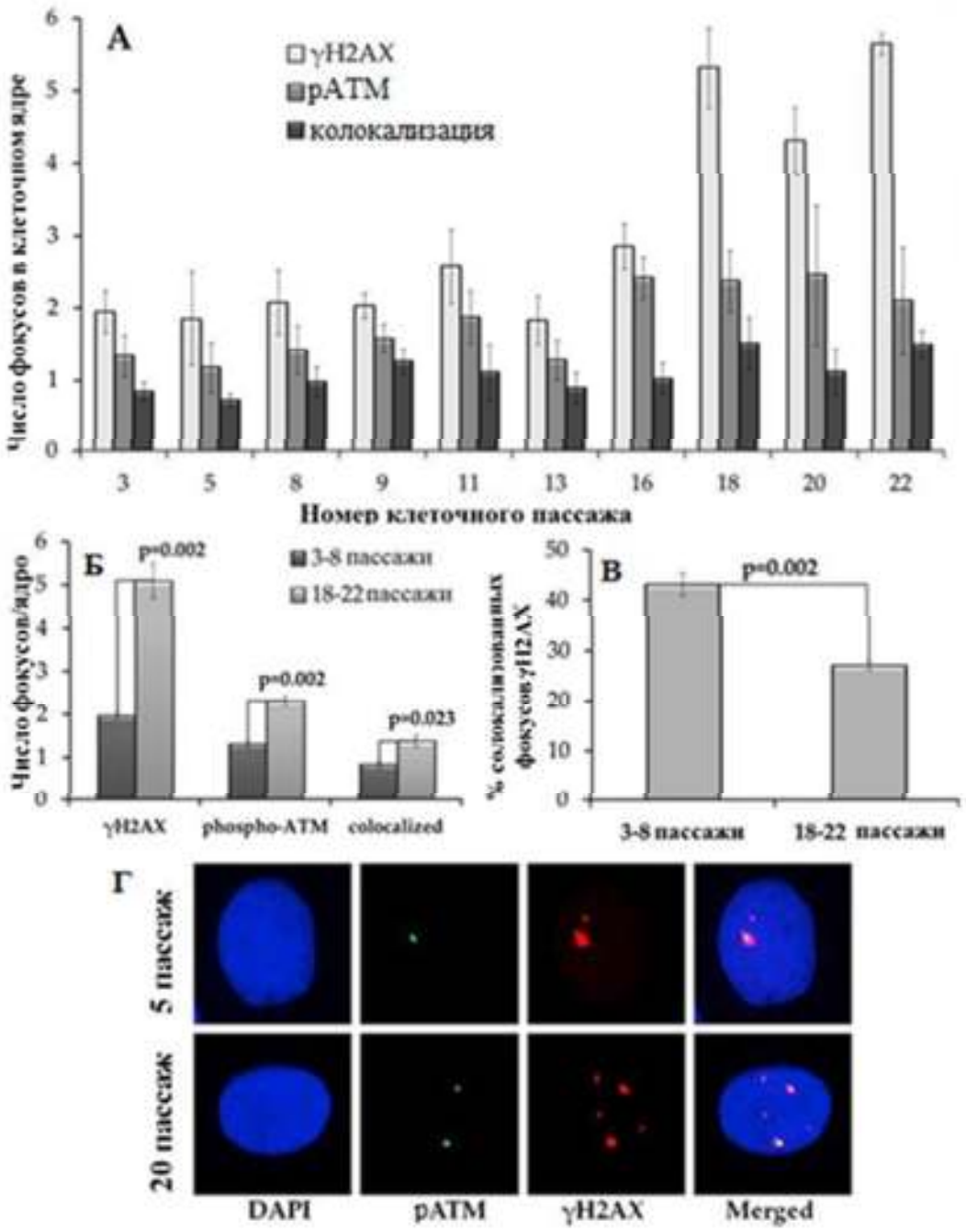


**Рисунок 3.1.** Иммуноцитохимический анализ фокусов γH2AX и pATM. (**А**) изменения числа фокусов γH2AX, pATM и их колокализации на 3-22 клеточных пассажах; (**Б**) сравнительный анализ γH2AX, pATM и их колокализации на ранних (3-8) и поздних (18-22) клеточных пассажах; (**В**) относительное количество (%) фокусов γH2AX, колокализованных с pATM, на ранних и поздних клеточных пассажах; (**Г**) микрофотографии флуоресцентно-окрашенных клеточных ядер на 5 и 20 клеточных пассажах. Ядра окрашены DAPI в синий цвет. Яркие зеленые и красные точки - фокусы pATM и γH2AX, соответственно.

Подобная картина наблюдается и для колокализованных фокусов γH2AX и pATM (рис. 3.1 А). Зависимость изменения числа колокализованных фокусов описывается линейным уравнением y=0,72+ 0,03*x (r=0,73; p=0,017), где y - число фокусов/ядро, а x - номер пассажа.

Представлялось интересным сравнить ранние (3-8) и поздние (18-22) клеточные пассажи. Как видно из рис. 3.1 Б, число γH2AX, pATM и колокализованных фокусов в клетках на поздних пассажах статистически значимо выше по сравнению с клетками на ранних пассажах. Однако если число фокусов γH2AX увеличивается в ~ 3 раза, то число pATM и колокализованных фокусов увеличивается всего ~ в 2 раза, соответственно. Сравнение доли фокусов γH2AX, колокализованных с pATM, показывает, что если на ранних пассажах с pATM было колокализовано 43±2 % фокусов γH2AX, то на поздних пассажах колокализация составляет всего 27±1 % (рис. 3.1 В). Таким образом, можно сделать предварительное заключение о том, что резкое увеличение числа фокусов γH2AX на поздних пассажах является ATM-независимым.

На рис. 3.2 представлены результаты подсчёта числа фокусов γH2AX в пролиферирующих (Ki67+) и покоящихся (Ki67-) клетках. Видно, что в пролиферирующих клетках число фокусов γH2AX на 3-16 пассажах меняется незначительно, а на 18-22 пассажах происходит их резкое увеличение (рис. 3.2 А). В покоящихся клетках наблюдается несколько иная картина (рис. 3.2 А). Также как в случае с фокусами pATM, изменение их числа от количества клеточных пассажей можно описать уравнением линейной регрессии y=0,02+0,12*x (r=0,96; p=0,00001), где y - число фокусов/ядро, а x - номер пассажа. Более того, между числом фокусов γH2AX и pATM на разных пассажах отмечается статически значимая корреляционная зависимость (r=0,87; p=0,001).

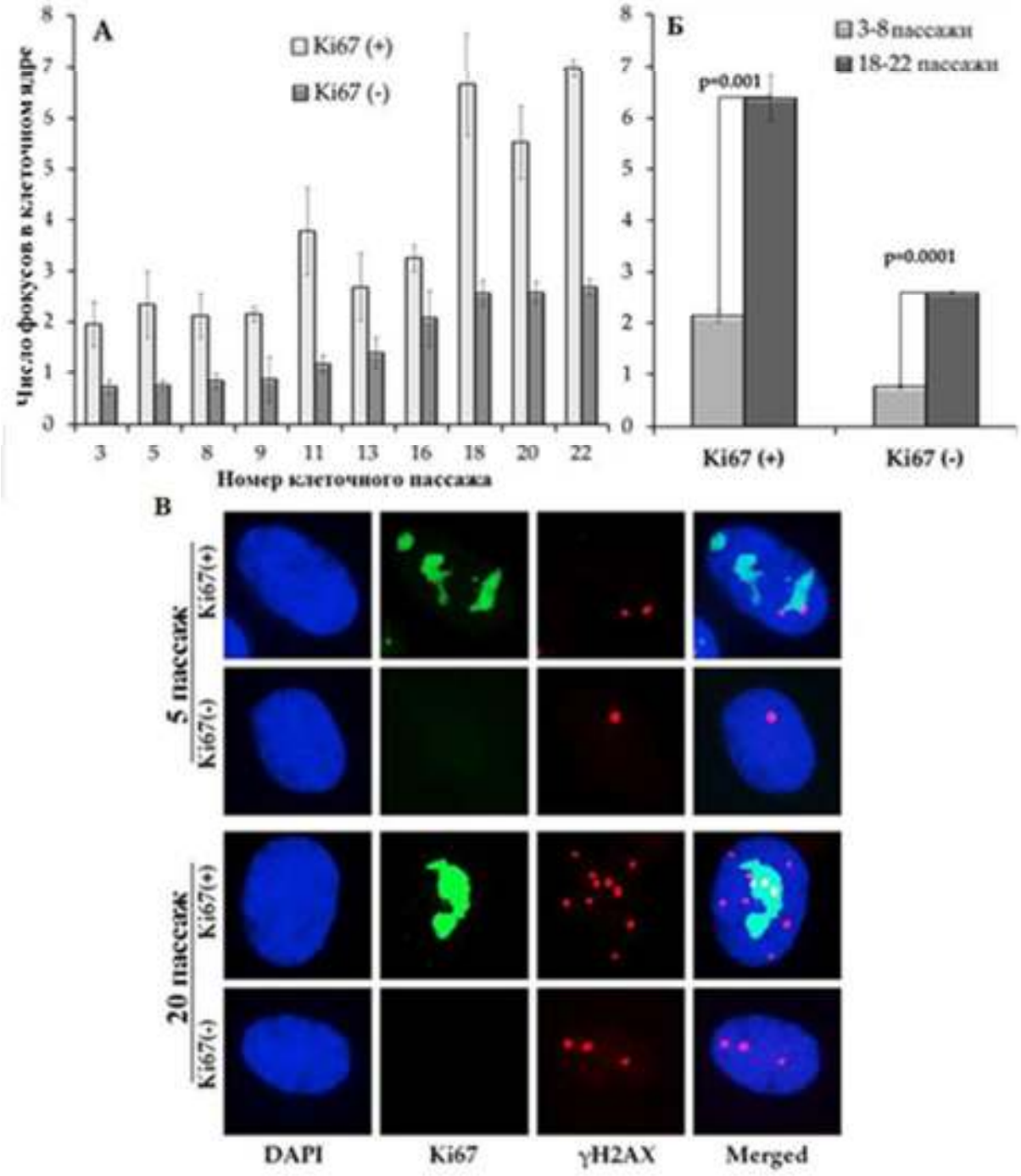


**Рисунок 3.2.** Дифференцированный иммуноцитохимический анализ фокусов γH2AX в Ki67+ и Ki67- клетках. (**А**) изменения числа фокусов γH2AX в Ki67+ и Ki67- клетках на 3-22 клеточных пассажах; (**Б**) сравнительный анализ γH2AX в Ki67+ и Ki67- клетках на ранних (3-8) и поздних (18-22) клеточных пассажах; (**В**) микрофотографии флуоресцентно окрашенных Ki67+ и Ki67- клеточных ядер на 5 и 20 клеточных пассажах. Ядра окрашены DAPI в синий цвет. Ki67 - зеленый, γH2AX - красный.

Сравнение числа фокусов в клетках на ранних и поздних пассажах показало, что в клетках на поздних пассажах число фокусов статически значимо выше, чем на ранних, ~ в 3 раза независимо от пролиферативной активности (рис. 3.2 Б). Однако абсолютное число фокусов различается: ~ 6,4 фокуса/клетку для пролиферирующих клеток и всего 2,6 фокуса/клетку для покоящихся. На основании этого можно заключить, что в пролиферирующих клетках на поздних пассажах задействован дополнительный механизм индукции ДР ДНК.

Обобщая полученные результаты, можно сделать заключение о том, что в длительно культивируемых МСК на поздних (18-22) пассажах наблюдается статистически значимое ($p<0,01$) увеличение числа фокусов γH2AX ~ в 3 раза по сравнению с клетками на ранних (3-8) пассажах. При этом можно говорить, по крайней мере, о двух параллельно текущих процессах, ведущих к увеличению числа фокусов γH2AX в длительно-культивируемых клетках.

Во-первых, это монотонное ATM-коррелирующее увеличение числа фокусов γH2AX в длительно- культивируемых клетках. Киназа ATM фосфорилирует гистон H2AX преимущественно в ответ на появление одиночных или множественных ДР ДНК [Caron P., 2015; Burma S., 2001], в отличие от ATR, осуществляющей фосфорилирование гистона H2AX в ответ на появление больших участков однонитевой ДНК (коллапс репликативных вилок, эксцизионная репарация нуклеотидов) [Ward I.M., 2001]. Таким образом, увеличение числа фокусов γH2AX, колокализованных с pATM, свидетельствует о накоплении ДР ДНК в длительно- культивируемых МСК. Возможно также, что это явление обусловлено накоплением ДР в теломерных участках ДНК. Так, результаты недавних исследований свидетельствуют о низкой эффективности репарации ДР в теломерной ДНК и накоплении фокусов γH2AX в теломерных повторах [Hewitt G., 2012; Fumagalli M., 2012]. Этот процесс тесно ассоциирован с клеточным старением и накоплением фокусов γH2AX в стареющих, потерявших

способность к делению клетках [Sedelnikova O.A., 2004]. В пользу этого предположения говорит показанное в нашей работе пассаж-зависимое постепенное увеличение числа фокусов γH2AX в покоящихся Ki67 негативных клетках. Поскольку накапливающиеся с увеличением пассажей МСК фокусы γH2AX были плохо колокализованы с pATM, что наблюдалось и в работе Поспелова с соавт. [Pospelova T.V., 2009], они также могут быть не связаны с повреждениями ДНК. Было показано, что такие фокусы связаны с сигнальными путями mTOR в стареющих клетках и могут быть ингибированы рапамицином.

Во-вторых, связанное с достижением определенного числа пассажей (в нашем случае 18-ти) резкое увеличение числа фокусов γH2AX, но не pATM. Этот феномен характерен только для пролиферирующих клеток. Таким образом, можно полагать, что он отражает увеличение ошибок, возникающих в процессе клеточной пролиферации, например, ДР ДНК, образующихся в результате коллапса вилок репликации на поздних пассажах, вызванного увеличением оксидативных повреждений вследствие ассоциированной со старением дисфункции митохондрий [Braidy N., 2011] или ассоциированного с митозом фосфорилирования H2AX по DNA-PKcs/CHK2 пути [Tu W.Z., 2013].

Другим объяснением увеличения числа фокусов γH2AX на поздних пассажах может быть их неэффективное дефосфорилирование, что также связано с процессами старения [Mamouni K., 2014; Liu B., 2012]. Более того, связанные с репликативным старением конформационные изменения хроматина также могут представлять собой источник образования дополнительных фокусов γH2AX на поздних пассажах МСК [Liu B., 2012]. Однако эта гипотеза не согласуется с результатами недавнего исследования с использованием другого маркера ДР ДНК, 53BP1 [White R.R., 2015]. Не исключено, что независимое от ATM фосфорилирование гистона H2AX на поздних пассажах может указывать на начало формирования в клетке фенотипа старения. Было показано, что киназная активность, определяемая

по концентрации и уровню фосфорилирования ATM после воздействия ИИ у старых мышей была ниже, чем у молодых [Feng Z., 2007]. Напротив, было показано, что ATM-зависимая реакция на повреждение ДНК предотвращает дальнейшее повреждение, индуцирует SASP и повышает защиту от злокачественной трансформации [Menendez J.A., 2011]. Снижение активности ATM может приводить к уменьшению активации p53-зависимых сигнальных путей в ответ на повреждение ДНК, индуцированное или спонтанное. В последствии это может приводить к резкому увеличению ДР ДНК в МСК на поздних пассажах и формированию фенотипа старения. Наконец, на различных тканях мыши и человека было показано, что возраст оказывает влияние на различные пути репарации ДНК [White R.R., 2013; Sukup-Jackson M.R., 2014; Vaidya A., 2014; MacRae S.L., 2015] и ее эффективность, что также может являться причиной накопления фокусов γH2AX в длительно-культивируемых МСК, полученных в данном исследовании. По-видимому, апоптотические клетки не играют роли в наблюдаемом накоплении маркеров генетической нестабильности, поскольку мы не наблюдали увеличения предположительно апоптотических клеток, содержащих > 25 фокусов γH2AX на клетку, и мы не обнаружили накопление ядер с апоптотической морфологией (данные не показаны).

Таким образом, нами было показано, что МСК на ранних пассажах (3-8) после выделения обладают наиболее оптимальными характеристиками, позволяющими использовать их в экспериментальной работе. Полученные результаты также могут быть использованы в клинической практике, поскольку увеличение количества полученных от донора МСК (около $10^{10}$ клеток на одно лечение) достигается путем экспансии выделенной культуры за счет увеличения числа клеточных пассажей [Meirelles Lda S., 2009].

## *3.2 Ранние радиационные эффекты*

### *3.2.1 Оценка изменений числа и колокализации фокусов γH2AX и pATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных рентгеновским излучением в малых дозах*

Одним из важных вопросов в радиационной биологии является вопрос зависимости наблюдаемых эффектов от дозы ионизирующего излучения. Поэтому нами был проведен детальный анализ изменений числа фокусов γH2AX, фокусов фосфорилированной (активной) ATM (pATM) и их колокализации в ранние временные сроки (5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин) после облучения в дозах 20, 40, 80, 160 и 250 мГр. Выбор этих временных сроков был обусловлен тем, что они (в особенности 15-30 мин) наиболее часто используется для построения зависимостей изменения числа фокусов γH2AX от дозы излучения. Результаты анализа дозовых зависимостей представлены графически на рис. 3.3. Через 5 мин после облучения зависимость числа фокусов γH2AX от дозы можно с высокой значимостью аппроксимации ($r=0,974$; $p=0,001$; $R^2=0,949$) описать линейным уравнением $y=(0,588\pm0,279) + (0,019\pm0,002)*x$, где y - среднее число фокусов в клеточном ядре, x – доза излучения в мГр (рис. 3.1). Таким образом, для МСК средний выход фокусов γH2AX на единицу поглощенной дозы через 5 мин после облучения равен ~ 19±2 фокусов на клетку/Гр. Число фокусов pATM от дозы излучения в эту временную точку неплохо описывается ($r=0,965$; $p=0,002$; $R^2=0,932$) линейной функцией $y=(0,813\pm0,110)+(0,006\pm0,001)*x$, где y - среднее число фокусов в клеточном ядре, x – доза излучения в мГр. При расчете на дозу 1 Гр получается всего 6±1 фокуса/клетку/Гр. Это свидетельствует о низкой активации ATM через 5 мин после облучения и об ATM-независимом характере фосфорилирования H2AX в ранние сроки после облучения. Увеличение времени инкубации клеток после облучения до 15 мин приводит к линейно-зависимому от дозы излучения увеличению числа фокусов γH2AX и pATM.

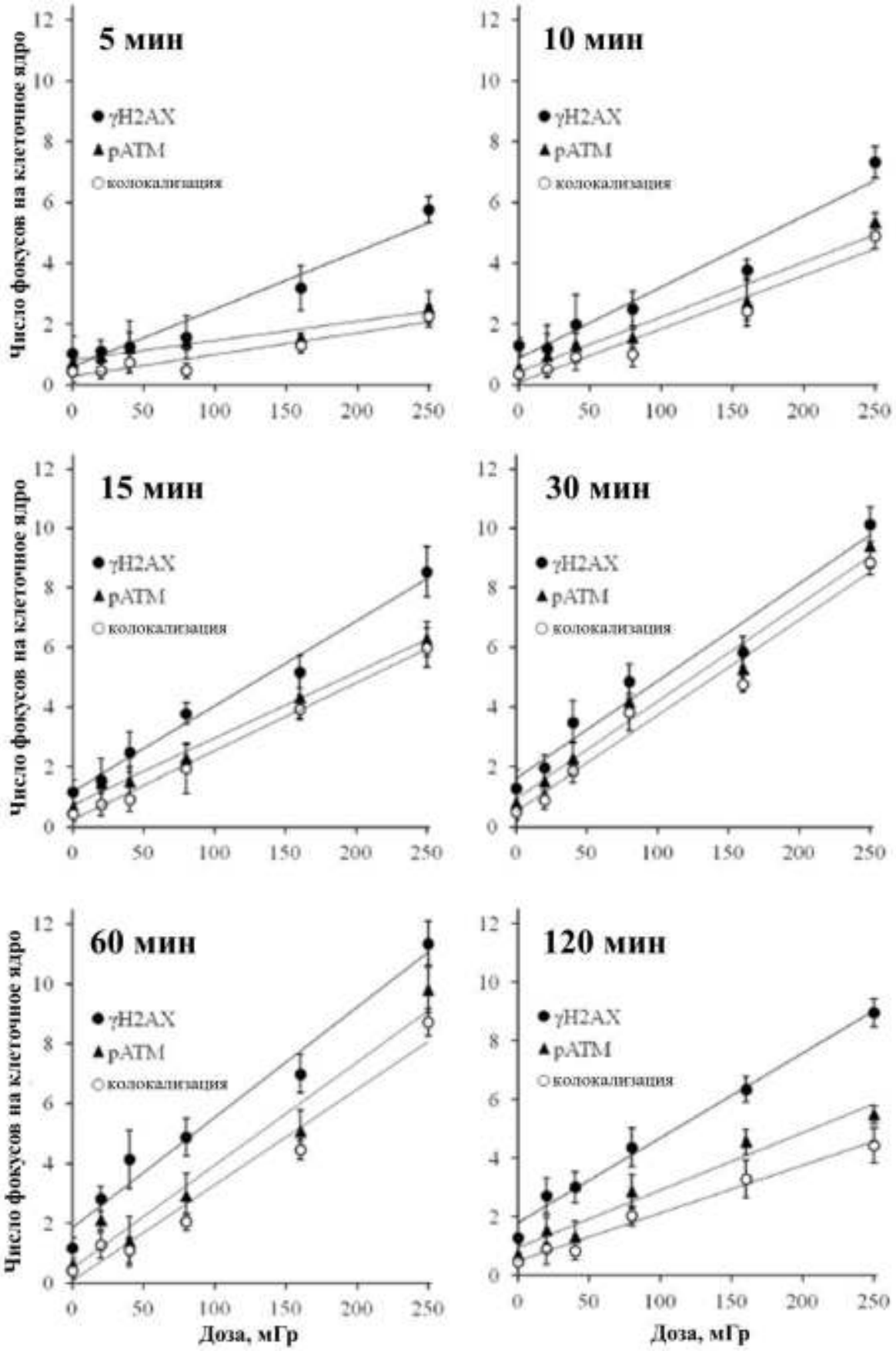


**Рисунок 3.3.** Зависимости числа фокусов γH2AX, pATM и их колокализизации в ядрах МСК человека от дозы рентгеновского излучения в различное время после воздействия.

Расчетное число фокусов γH2AX и pATM на клетку/Гр через 15 мин после облучения соответствует 29±2 и 22±1, соответственно. Обращает на себя внимание тот факт, что наибольшая колокализация фокусов γH2AX и pATM наблюдается через 30 мин после облучения. В эту временную точку зависимость числа фокусов γH2AX от дозы описывается линейным уравнением y=(1,600±0,421)+(0,033±0,003)*x (r=0,980; p=0,0006; $R^2$=0,960), а дозовая зависимость pATM - y=(0,931±0,334) + (0,032±0,003)*x (r = 0,987; p = 0,0002; $R^2$ = 0,974), где y - среднее число фокусов в клеточном ядре, x – доза излучения в мГр. В пересчете на 1 Гр, для γH2AX получается 33±3, а для pATM 32±3 фокуса/клетку/Гр. То есть, количественный выход фокусов γH2AX и pATM на единицу дозы через 30 мин после воздействия рентгеновского излучения практически совпадает. При дальнейшем увеличении времени инкубации до 60 мин количественный выход фокусов γH2AX на дозу несколько увеличивается (37±3 фокуса/клетку/Гр), в то время как выход pATM практически не меняется (34±4 фокуса/клетку/Гр). Через 120 мин после облучения наблюдалось снижение числа фокусов как γH2AX, так и pATM, что обычно указывает на процесс восстановления поврежденных цепей ДНК. На рисунке 3.4 представлены микрофотографии фокусов γH2AX и pATM в ядрах МСК человека через 30 минут после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-250 мГр. На микрофотографиях ясно прослеживается тенденция к увеличению числа фокусов в клеточном ядре с увеличением дозы излучения.

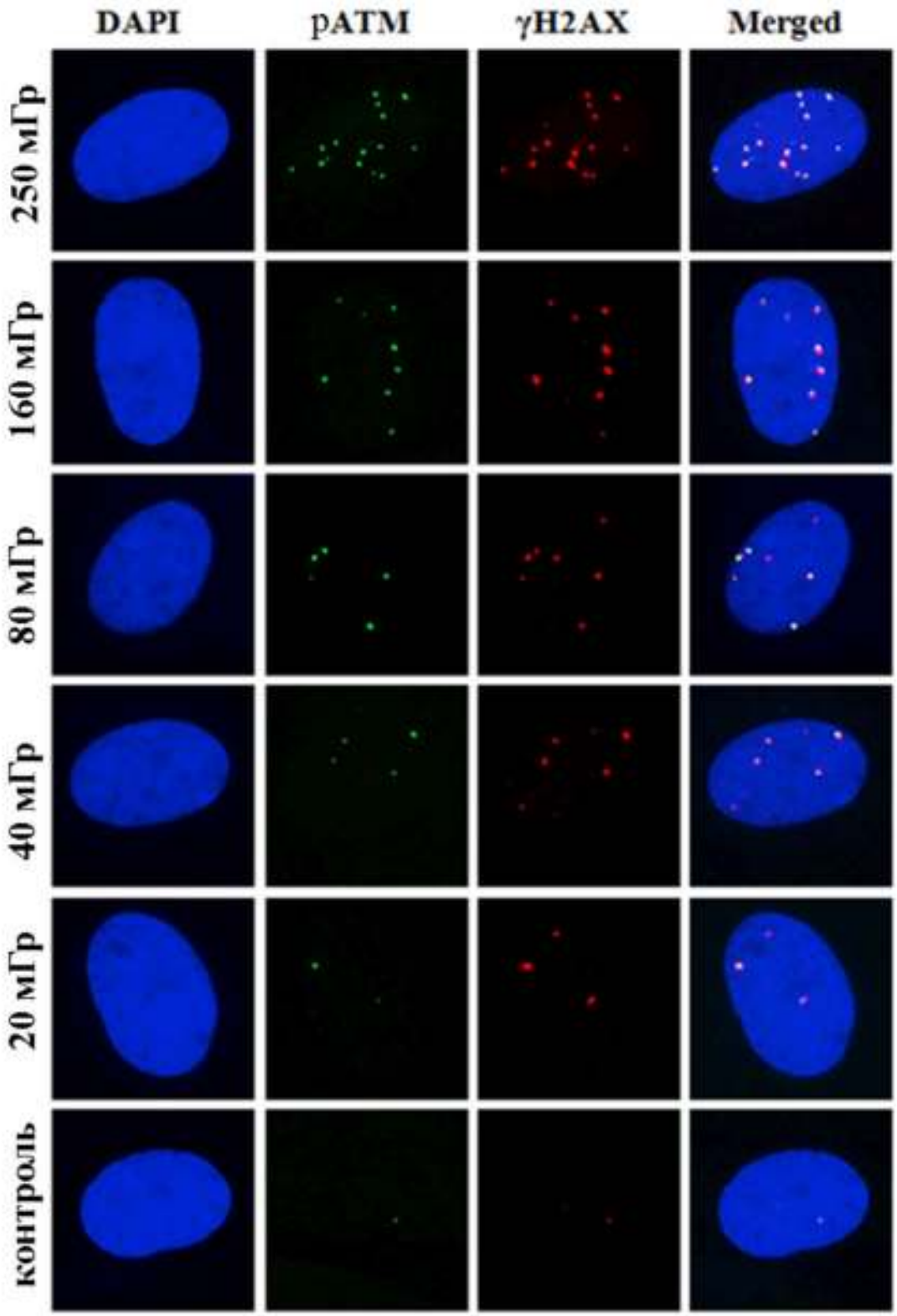


**Рисунок 3.4** Микрофотографии фокусов γH2AX и pATM в ядрах МСК человека через 30 минут после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-250 мГр. Фокусы pATM -зеленые, γH2AX-красные. Ядра окрашены DAPI в синий цвет.

Результаты исследования кинетики изменения числа фокусов γH2AX, pATM и их колокализации в культивируемых МСК человека после облучения в дозах 20, 40, 80, 160 и 250 мГр представлены на рис. 3.5. Было показано, что после облучения в дозе 250 мГр наблюдается увеличение числа фокусов γH2AX с максимумом на 1 ч, после чего в течение последующих 3 ч происходит уменьшение их числа до ~ 40 % от наблюдаемого в точке максимума ($p$ = 0,0004). Уменьшение дозы до 160 мГр отражается на кинетике процесса: снижение числа фокусов γH2AX происходит более медленно и через 4 ч после облучения остается уже ~ 60 % фокусов ($p$ = 0,0487). Дальнейшее снижение дозы рентгеновского излучения до 80, 40 и 20 мГр (диапазон малых доз) приводит к тому, что число фокусов γH2AX статически значимо не уменьшается через 4 ч после облучения ($p$=0,334, p=0,232 и p=0,607 соответственно) (рис. 3.5). Похожие закономерности наблюдались ранее в первичных фибробластах человека, но при облучении в гораздо более низких дозах (2.5-10 мГр) [Grudzenski S., 2010]. Авторы объясняли этот феномен индуцибельностью репарации ДНК в клетках млекопитающих при облучении в очень малых дозах. Однако в нашем случае отмечается эффективное фосфорилирование H2AX после облучения в малых дозах, свидетельствующее о распознавании ДР и начале процессов их репарации. Логичнее объяснить наблюдаемый эффект замедленной деградацией фокусов γH2AX или их возникновением *de novo*.

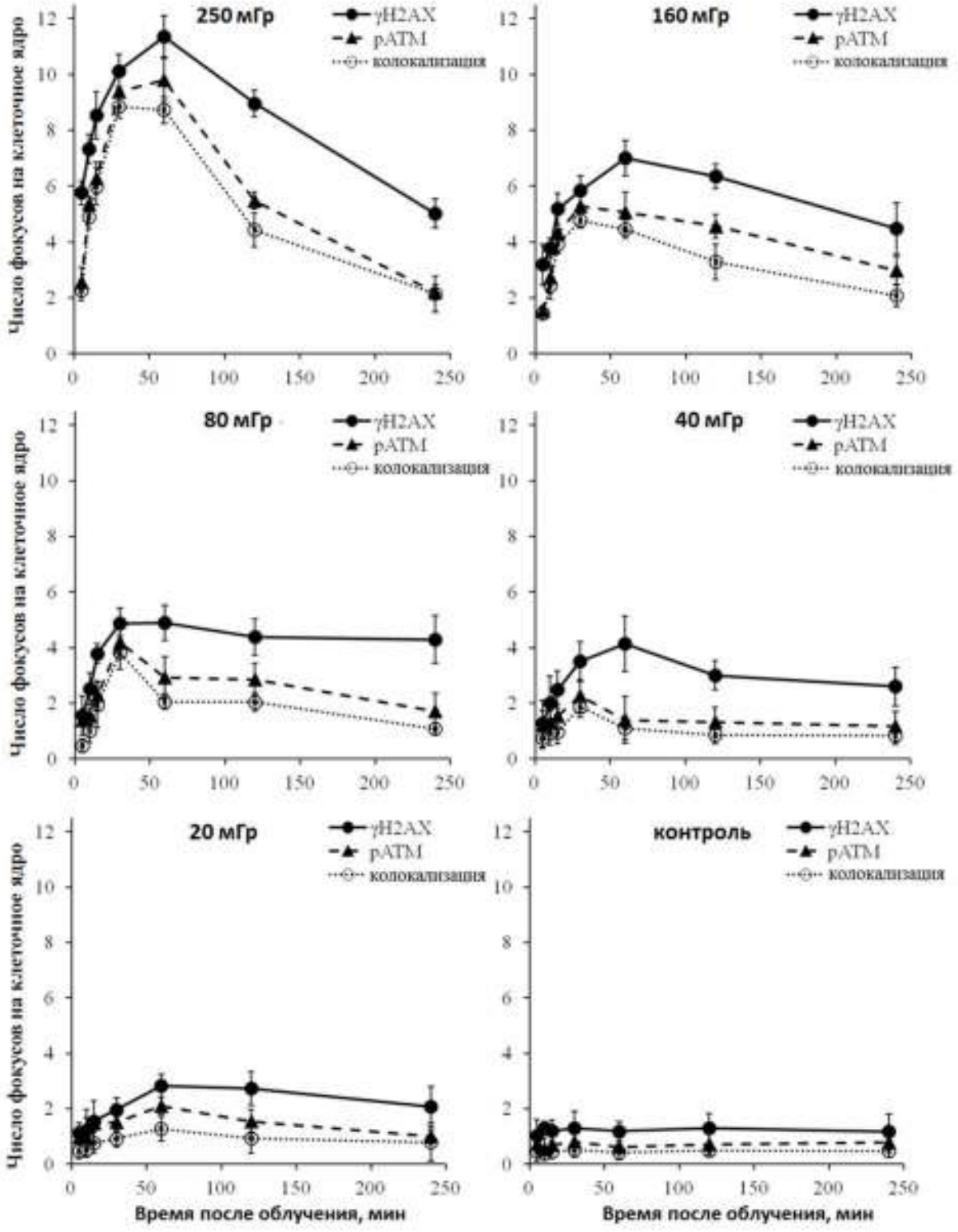


**Рисунок 3.5.** Кинетики изменения числа фокусов γH2AX, pATM и их колокализизации в ядрах МСК человека после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-250 мГр.

Результаты анализа фокусов pATM и их колокализации с фокусами γH2AX свидетельствуют о том, что в случае облучения в дозе 250 мГр максимум активности ATM приходится на 30-60 мин после облучения (рис. 3.5). Как уже отмечалось ранее при анализе дозовых зависимостей, уже через 5 мин после облучения отмечается увеличение числа фокусов γH2AX, неколокализованных с фокусами pATM, для дозы 160 и 250 мГр. Предполагается, что в клетках млекопитающих сразу после облучения (2-10 мин) происходит активация киназы DNA-PKcs, а уже позже (10-56 мин) активация ATM [Reitsema T., 2005]. Активация ATM является сложным многоступенчатым процессом. Первичная активация ATM происходит при участии MRN-комплекса и заключается в диссоциации неактивных димеров ATM. Такая частично активированная ATM может участвовать в фосфорилировании некоторых белков, включая гистон H2AX. Тем не менее, для полной активации ATM необходимо двухступенчатое аутофосфорилирование этой киназы [Bakkenist C. J., 2003]. Поэтому в ранние сроки после облучения (до 10 мин) мы наблюдаем процессы фосфорилирования H2AX, предположительно обусловленные DNA-PKcs, а в более поздние (15-60 мин) - ATM. Обращает на себя внимание тот факт, что фокусы pATM, как правило, колокализованы с γH2AX (рисунки 3.3 и 3.5). В то время как фокусы γH2AX, в особенности в ранние (5-10 мин) и поздние (2-4 ч) времена после облучения часто не колокализованы с pATM (чем больше расстояние между темными и светлыми кружками на рис. 3.3, тем меньше колокализация фокусов γH2AX и pATM). То есть, в этих случаях фосфорилирование H2AX происходит без участия ATM. Через 30 мин после облучения степень колокализации фокусов γH2AX и pATM является максимальной (почти перекрывающиеся темные и светлые кружки на рис. 3.3).

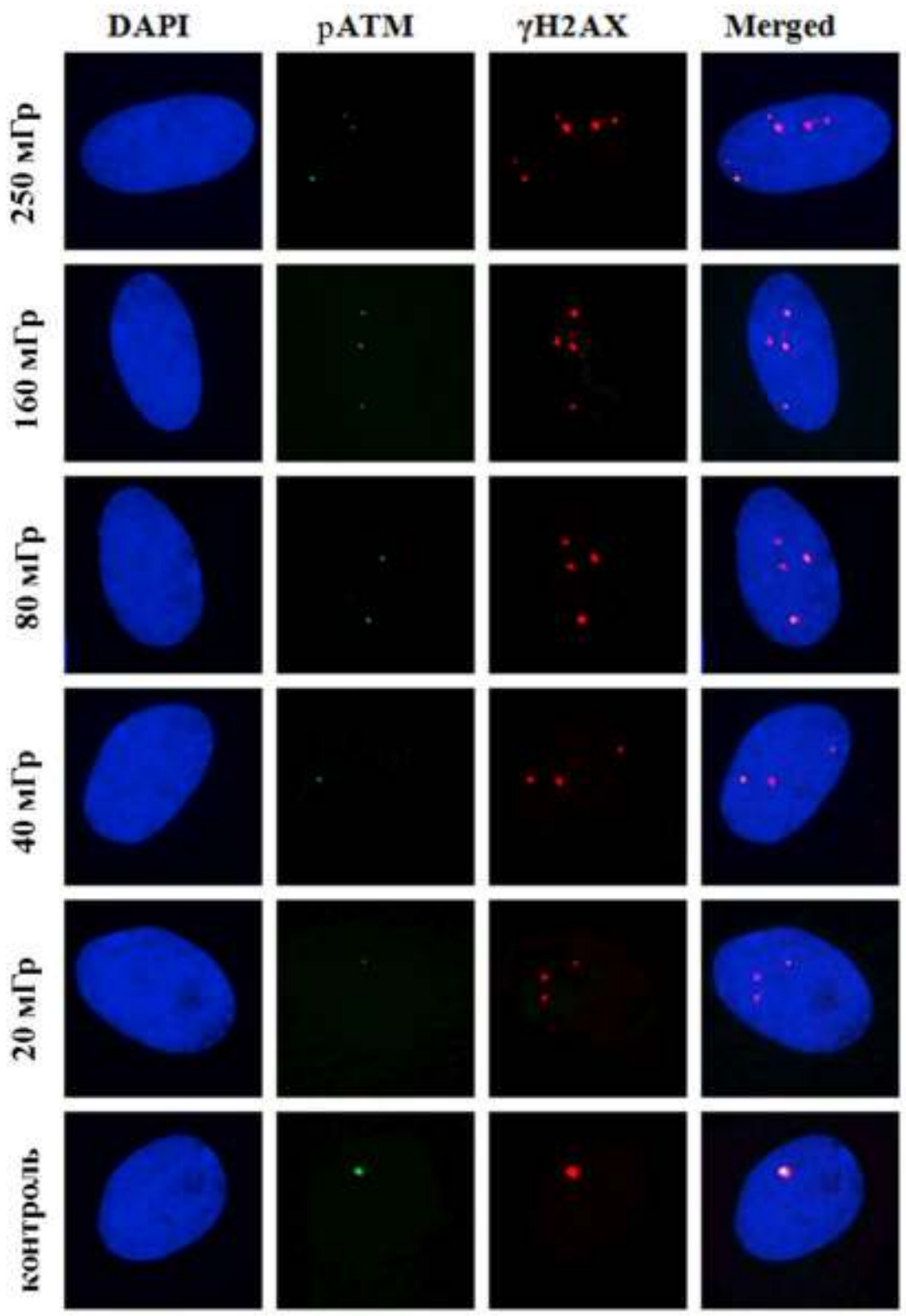


**Рисунок 3.6** Микрофотографии фокусов γH2AX и pATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток человека через 240 минут после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-250 мГр. Фокусы pATM – зеленые, γH2AX-красные. Ядра окрашены DAPI в синий цвет.

При сравнении накладываемых микрофотографий фокусов γH2AX и pATM («Merged» на рис. 3.4 и 3.6) становится очевидным, что через 30 минут после облучения для некоторых доз только единичные фокусы γH2AX (красные фокусы) не были колокализованы с фокусами pATM (зеленые фокусы). В то же время через 240 минут после облучения во всем изученном диапазоне доз число неколокализованых фокусов γH2AX было существенным. Более того, становится очевидным, что степень колокализации зависит от дозы. В самом деле, для малых доз (ниже 160 мГр) степень колокализации фокусов была меньше, чем для средних.

После облучения в дозах 40 и 80 мГр максимум фокусов pATM наблюдался через 30 мин, после чего отмечалось снижение числа как самих фокусов pATM, так и фокусов pATM, колокализиванных с γH2AX, практически до контрольных значений (рис. 3.5). В клетках, облученных в дозе 20 мГр, отмечались похожие процессы, но с максимумом фокусов pATM на 60 мин. Это свидетельствует о том, что механизмы поддержания высокого числа фокусов γH2AX через 2-4 ч после облучения в малых дозах являются ATM независимыми.

Мы провели корреляционный анализ, чтобы определить степень колокализации γH2AX и pATM в зависимости от дозы через 15, 30 и 60 мин. после облучения (Рис. 3.7 А, Б, В). Анализ выявил статистически значимую корреляцию между степенью колокализации фокусов и дозой излучения для всех исследуемых временных точек (Рис. 3.7 А, Б, В). Однако для доз 0-80 мГр только через 30 мин (точка максимального выхода γH2AX и pATM) наблюдалось дозо-зависимое увеличение степени колокализации (Рис. 3.7 Б). Подобной зависимости не наблюдалось через 15 и 60 мин после облучения (Рис. 3.7 А, В). Затем мы провели сравнительный анализ изменения степени колокализации фокусов γH2AX и pATM для группы малых (20, 40 и 80 мГр) и средних (160 и 250 мГр) доз во всех исследованных временных точках.

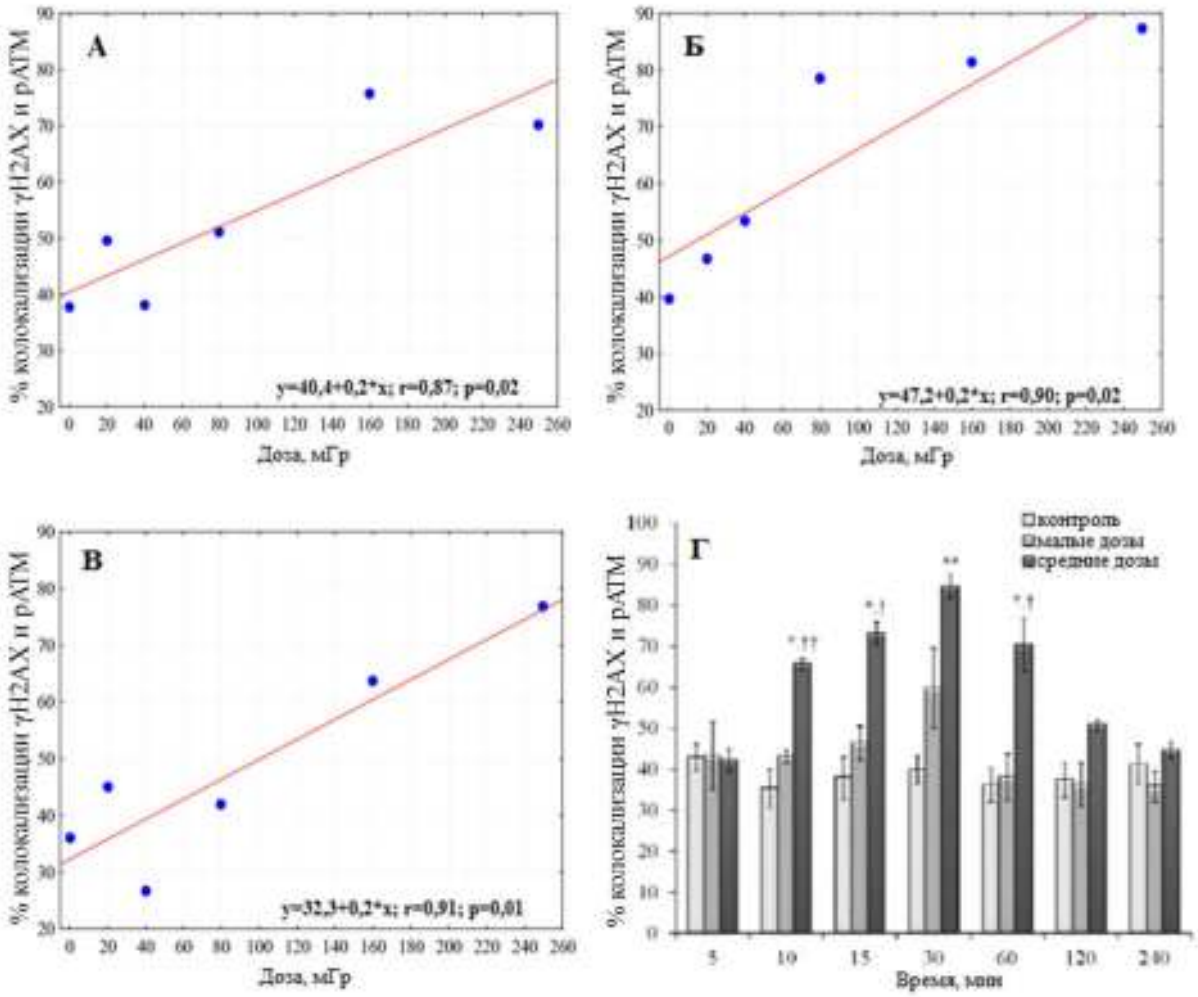


**Рисунок 3.7** Оценка колокализации фокусов γH2AX и pATM для малых и средних доз (**А, Б, В**). Процент фокусов γH2AX, колокализованных с фокусами pATM, был построен относительно дозы излучения для 15 минут (**А**) 30 мин. (**Б**) и 60 минут (**В**) после облучения. Линейная функция использовалась для описания статистически значимых отношений, с параметрами, указанными на соответствующих графиках. **Г**. Доли фокусов γH2AX, колокализованных с фокусами pATM, были объединены в две отдельные группы для малых (20, 40 и 80 мГр) и средних (160 и 250 мГр) доз. Результирующие кумулятивные проценты представлены как столбцы для обеих групп доз и контроля, и для каждой исследуемой временной точки. † и †† обозначают статистически значимое различие между группами малых и средних доз (p <0,05 и 0,01 соответственно). * и ** обозначают статистически значимое различие между группами контроля и средних доз (p <0,05 и 0,01 соответственно).

Результаты этого сравнения, представленные на рисунке 3.7 Г, выявили значительно меньшую степень колокализации фокусов γH2AX и pATM для малых доз по сравнению со средними.

Таким образом, на данном этапе нашего исследования мы использовали дозы, которые можно условно разделить на две группы - малые и средние. Первая группа включала дозы 20, 40 и 80 мГр. Вторая группа включала дозы 160 и 250 мГр. Поскольку молекулярные реакции в ответ на облучение являются динамическими процессами, которые развиваются и изменяются со временем, важно было также охватить несколько временных точек. Чаще всего кинетика образования фокусов γH2AX исследуется в течение 15-60 мин после облучения [Lobrich M., 2010; Neumaier T., 2012]. Такие же временные точки используются для оценки количества фокусов pATM. Колокализация фокусов pATM и γH2AX обычно рассматривается как подтверждение ATM-зависимого характера фосфорилирования фокусов γH2AX. Наш подробный (по времени и дозе) анализ образования фокусов γH2AX и pATM в МСК привел к нескольким интересным выводам, описанным ниже.

Во-первых, мы обнаружили линейную дозовую зависимость как для фокусов γH2AX, так и для фокусов pATM во всех исследуемых временных точках. В зависимости от дозы максимальный ответ наблюдался через 60 мин для γH2AX и через 30-60 мин для pATM. Среднее число фокусов на клетку на Гр, вычисленное математически из линейных уравнений во время максимального отклика, составляло 37 ± 3 и 32 ± 3 для γH2AX и pATM соответственно. Аналогичные дозовые кривые и количества фокусов были получены в течение 120 мин после облучения для других нормальных клеток человека, однако с использованием более высоких доз [Mariotti L.G, 2013]. Полученные нами результаты показывают, что ранние молекулярные реакции МСК на образовавшиеся в результате воздействия ИИ ДР ДНК являются нормальными и аналогичны таковым в дифференцированных клетках.

Во-вторых, и, что более интересно, заметные различия в кинетике фокусов γH2AX по сравнению с pATM наблюдались в период времени между 60 и 240 мин после облучения (рисунок 3.5). Скорость деградации фокусов γH2AX в МСК, обычно отражающая скорость воссоединения концов поврежденной ДНК, по-видимому, зависит от дозы излучения: чем ниже доза, тем ниже скорость воссоединения.

Действительно, через 240 мин после воздействия рентгеновского излучения в дозе 250 мГр исчезло 60% от максимального числа фокусов γH2AX. Это же значение для дозы 160 мГр составило всего лишь 40%, в то же время для 20-80 мГр значительного уменьшения числа фокусов не наблюдалось (рис.3.5). Можно предположить, что ДР ДНК, образовавшиеся в результате облучения в малых дозах, не репарируются так же эффективно, как при облучении в средних дозах ИИ. Действительно, явление длительного присутствия фокусов γH2AX наблюдалось в облученных альфа-частицами нормальных фибробластах человека и было связано с более высокой сложностью образовавшихся ДР ДНК по сравнению с быстро деградирующими фокусами γH2AX, наблюдавшимися после воздействия γ-излучения [Antonelli F., 2015]. Аналогичные результаты были получены для непролиферирующих клеток эпителия молочной железы человека, облученных ионами железа [Groesser T., 2011]. Однако используемые в этих работах дозы были значительно выше (0,5-2 Гр), чем дозы, использованные в нашем исследовании. С другой стороны, маловероятно, чтобы с уменьшением дозы излучения с низкой линейной передачей энергии (ЛЭП), такого как рентгеновское излучение, использованное в нашем исследовании, увеличивалась сложность ДР ДНК. Дозо-зависимые закономерности кинетики образования фокусов, аналогичные обнаруженным в нашем исследовании, были получены для первичных культур фибробластов человека в диапазоне более низких доз: между 2,3 и 10 мГр [Grudzenski S., 2010]. Авторы также показали, что после предварительной обработки 10 мкМ пероксида водорода первичные фибробласты человека могут эффективно

восстанавливать ДР ДНК, индуцированные облучением в дозе 1 мГр. Это свидетельствует в пользу индуцибельного характера репарации ДР ДНК и предоставляет еще один аргумент против объяснения длительного присутствия фокусов γH2AX после облучения в малых дозах сложностью образовавшихся ДР ДНК. Альтернативным объяснением может быть *de novo* образование дополнительных фокусов, которые не обязательно связаны с радиационно-индуцированными ДР ДНК. Скорее всего, они представляют собой временные фокусы, образовавшиеся в S-фазе клеточного цикла после остановки вилки репликации, которая может произойти в результате образования эндогенных или индуцированных однонитевых разрывов ДНК [Saleh-Gohari N., 2005]. В отличие от фокусов γH2AX, кинетика фокусов pATM не зависела от дозы излучения, и их эффективная деградация наблюдалась во всем изученном диапазоне доз. Такая несвязанная кинетика фокусов для двух белков после воздействия малых доз ИИ показывает, что статус фосфорилирования H2AX в МСК независим от активированной ATM.

В-третьих, анализ выявил зависимость степени колокализации γH2AX и pATM от дозы излучения (рис. 3.5). Более того, при рассмотрении отдельно групп малых и средних доз наблюдалась слабая корреляция между степенью колокализации фокусов γH2AX с pATM и дозой излучения. Из этого следует, что две дозовые группы качественно различаются с точки зрения того, как молекулярные реакции на образование ДР ДНК реализуются в МСК. Для малых доз эти различия наблюдаются, во-первых, в длительном присутствии фокусов γH2AX и, во-вторых, в низкой степени колокализации фокусов γH2AX и pATM. Последнее четко продемонстрировано на рис. 3.7 Г, где статистически значимые различия в степени колокализации γH2AX и pATM наблюдаются между группами малых и средних доз (данные для 20-80 мГр были объединены в группу малых доз, а 160 и 250 мГр в группу средних доз).

Стоит заметить, что степень колокализации фокусов для малых доз была схожа с таковой в необлученном контроле во всех временных точках, кроме 30 минут, где наблюдалась максимальная колокализация. Низкая

степень колокализации γH2AX и pATM в первые 15 минут после облучения может быть объяснена низким числом фокусов pATM сразу после облучения. Это может быть связано с пределом обнаружения или тем фактом, что активации ATM, возникающей через 10-60 мин после образования повреждения ДНК, как полагают, предшествует очень ранняя (2-10 мин) активация DNA-PKcs, которая также является киназой, способной осуществлять фосфорилирование H2AX [Flassig R.J., 2014].

Как упоминалось ранее, отсутствие колокализации фокусов γH2AX и pATM через 60-240 мин после облучения в малых дозах может указывать на нерадиационно-индуцированный характер фокусов или ДР ДНК. Фокусы γH2AX могут образовываться в стареющих клетках, и в этом случае они не имеют прямого отношения к повреждению ДНК или, по крайней мере, к экзогенно- индуцированному повреждению ДНК [Pospelova T.V., 2009; Darzynkiewicz Z., 2009]. Однако развитие признаков преждевременного старения, вызванного стрессом, обычно требует больших периодов времени после воздействия. Поэтому данная вероятность исключается в связи с результатами, полученными через 4 ч после облучения.

Гистон H2AX может быть фосфорилирован не только киназой ATM, но также DNA-PKcs и ATR-киназами, активация которых не всегда инициируется образованием радиационно-индуцированных ДР ДНК [Stiff T., 2004; Ward I.M., 2001]. Поэтому в качестве гипотезы, объясняющей феномен поддержания высокого числа фокусов γH2AX после облучения в малых дозах, можно предположить дополнительное фосфорилирование H2AX киназой ATR. Эта киназа активируется преимущественно в S фазе в ответ на коллапс репликативных вилок. В отличие от ATR, активность ATM в S фазе существенно не меняется, а спонтанное фосфорилирование ATM наблюдается редко. Одновременная гиперпродукция свободных радикалов, часто наблюдаемая после воздействия ионизирующего излучения в малых дозах, и стимуляция пролиферации МСК может приводить к репликативному стрессу и генерации вторичных ДР. Феномен стимуляции пролиферации

малыми дозами рентгеновского излучения (50 и 75 мГр) был показан для МСК костного мозга крыс. При этом максимальное увеличение доли клеток в S фазе наблюдалось как раз через 2-6 ч после облучения [Liang X., 2011]. В пользу выдвинутой гипотезы говорит и факт снижения числа фокусов pATM через 2-4 ч после облучения. Важно отметить, что ДР, возникающие в результате коллапса репликативных вилок, репарируются путем медленного, но более корректного механизма ГР и поэтому, в целом, представляют меньшую опасность для дальнейшей судьбы клетки по сравнению с радиационно-индуцированными ДР [Saleh-Gohari N., 2005].

### *3.2.2 Сравнительные исследования изменений числа и колокализации фокусов γH2AX и pATM в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных в дозах 80 и 1000 мГр*

Для проверки выдвинутой выше гипотезы было решено провести сравнительные исследования кинетики образования и деградации фокусов γH2AX и pATM в покоящихся и пролиферирующих МСК костного мозга человека после воздействия рентгеновского излучения в малой (80 мГр) и средней (1000 мГр) дозах. При этом выбор дозы 80 мГр был обусловлен тем, что такая доза ИИ может быть получена пациентом суммарно при прохождении нескольких медицинских диагностических или лечебных процедур, например, КТ. В свою очередь, доза 1000 мГр была выбрана из диапазона средних доз [UNSCEAR, 2012], поскольку наблюдаемые радиобиологические эффекты после облучения в этой дозе уже ярко выражены.

Для исследований пострадиационных изменений числа фокусов γH2AX в облученных МСК нами были выбраны временные точки: 0,5, 4 и 24 ч после облучения. Как было показано ранее, именно через 0,5 ч после облучения в дозе 80 мГр наблюдается максимальное число фокусов γH2AX в МСК

человека. При этом известно, что примерно через 4-6 ч после облучения заканчивается быстрая фаза репарации ДР, за время которой репарируется ~ 80 % ДР ДНК, а к 24 ч медленная фаза репарации [Goodarzi A.A., 2010].

Результаты исследований показали, что кинетика пострадиационных изменений числа фокусов γH2AX после облучения в дозах 80 и 1000 мГр существенно отличается (рис. 3.8).

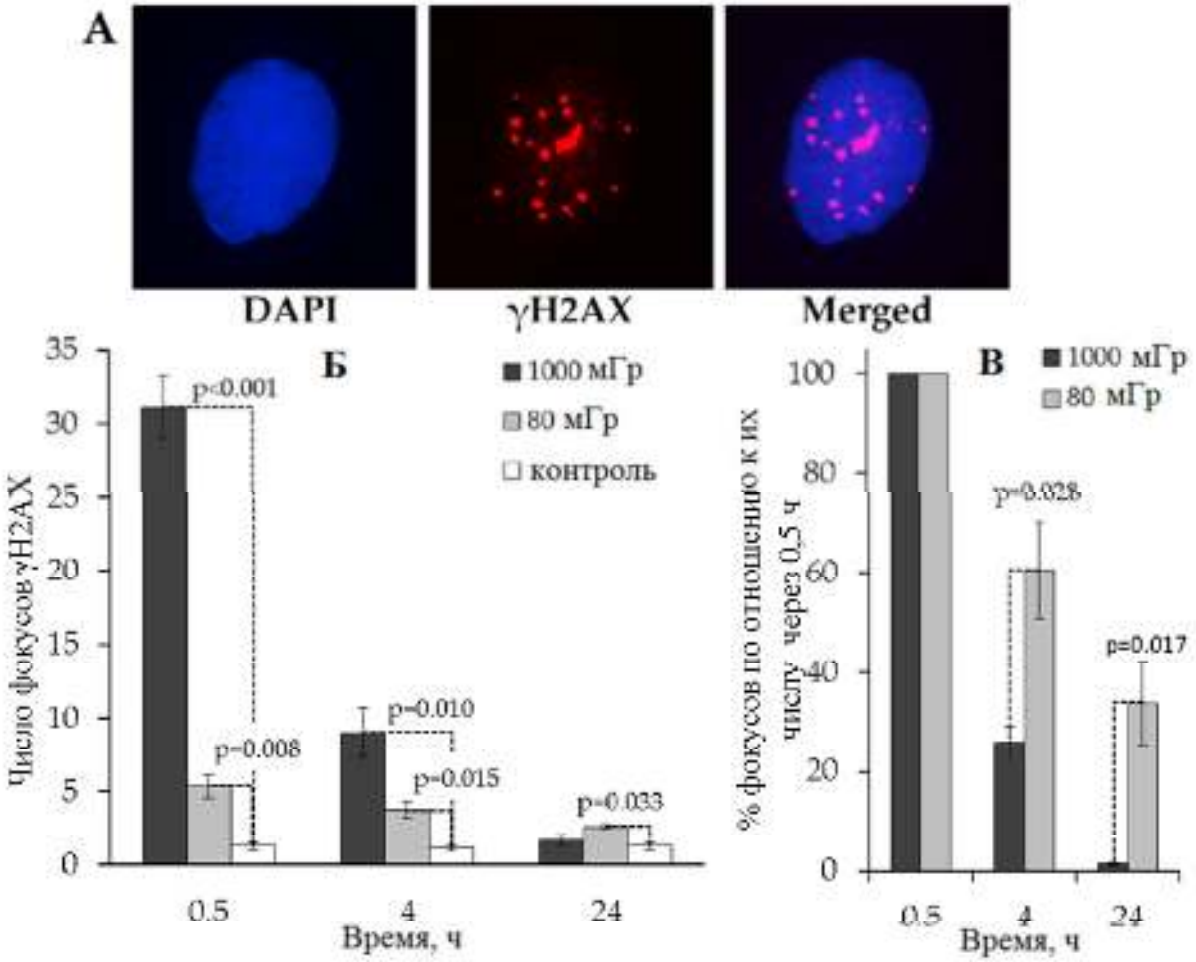


**Рисунок 3.8.** Иммуноцитохимический анализ фокусов γH2AX в МСК, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (**А**) Микрофотографии МСК, окрашенных DAPI и флуоресцентно-мечеными антителами к γH2AX. (**Б**) Число фокусов в клетках, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (**В**) Доля фокусов в процентах от числа, образующегося через 0,5 ч после облучения.

В то время как через 4 ч после облучения в дозе 1000 мГр регистрируется только 25,8±3,1 % фокусов от наблюдаемого через 0,5 ч (рис. 3.8 В), то через 4 ч после облучения в дозе 80 мГр – 60,5±9,8 % (рис. 3.8 В). Через 24 ч после облучения различия становятся еще более выраженными: 1,3±0,4 % в клетках, облученных в дозе 1000 мГр и 33,6±8,2 % после облучения в дозе 80 мГр (рис. 3.8 В). Число фокусов γH2AX через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр было также статистически значимо (p=0,033) выше контрольных значений (рис. 3.8 Б).

На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что даже через 24 ч после облучения в малой дозе в асинхронной популяции МСК человека наблюдается феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γH2AX.

Результаты исследований пострадиационных изменений числа фокусов γH2AX, колокализованных с фокусами фосфорилированной киназы ATM, показали, что через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр доля фокусов γH2AX, колокализованных с pATM, не отличалась от контрольного уровня. Это может свидетельствовать о том, что наблюдаемые после облучения в дозе 80 мГр остаточные фокусы γH2AX могут быть ATM-независимыми. Анализ изменений числа колокализованных фокусов показал, что через 4 ч после облучения их число снижается до ~ 24-32 %, а через 24 ч до 4-6 % от числа зарегистрированного через 0,5 ч после облучения (рис. 3.9 В). При этом не отмечалось статистически значимых различий между клетками, облученными в малой и средней дозах (рис. 3.9 В). Уже через 4 ч после облучения в малой дозе абсолютное число колокализованных фокусов статистически достоверно не отличалось от контрольных значений (рис. 3.9 Б).

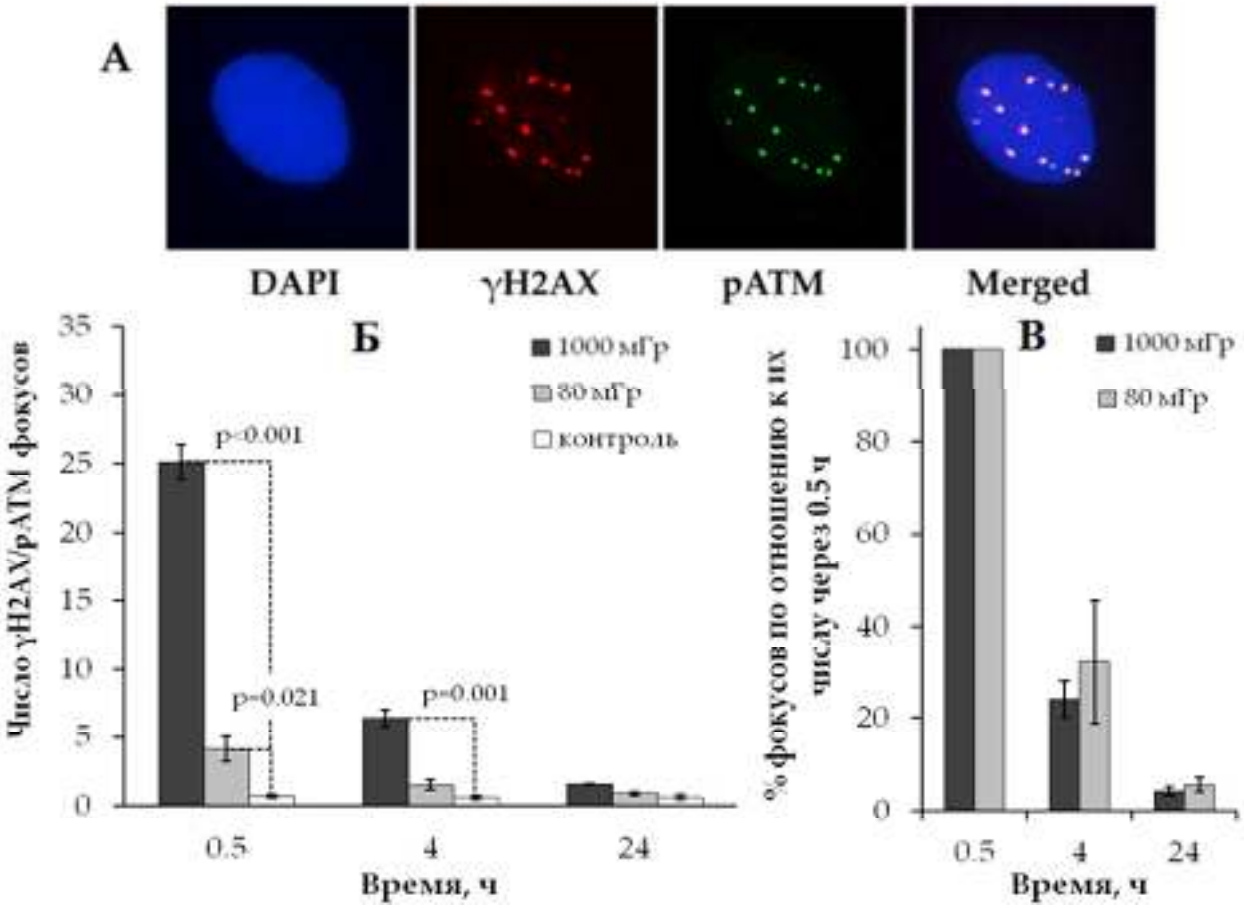


**Рисунок 3.9.** Иммуноцитохимический анализ колокализации фокусов γH2AX/pATM в МСК, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (**А**) Микрофотографии МСК, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к pATM (зеленые фокусы) и γH2AX (красные фокусы). Ядра окрашены DAPI (синий). (**Б**) Сравнительные изменения колокализации фокусов γH2AX/pATM в клетках, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (**В**) Доля фокусов в процентах от числа, образующегося через 0,5 ч после облучения.

Таким образом, результаты исследований подтверждают наше предыдущее заключение о том, что киназа ATM не задействована в длительном поддержании повышенного числа фокусов γH2AX в МСК, облученных в малой дозе рентгеновского излучения.

### *3.2.3 Анализ изменения числа фокусов γH2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках*

Известно, что процессы индукции и репарации ДР ДНК в пролиферирующих и покоящихся клетках существенно различаются. Как уже было сказано ранее, одним из источников ДР ДНК в пролиферирующих клетках является коллапс репликативных вилок в S фазе клеточного цикла. Было логично предположить, что феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γH2AX в МСК, облученных в малой дозе, обусловлен не неэффективной репарацией первичных радиационно-индуцированных ДР ДНК, а их образованием *de novo* в пролиферирующих клетках. Для проверки этого предположения был проведен дифференцированный анализ пострадиационных изменений числа фокусов γH2AX в покоящихся и пролиферирующих клетках с использованием белка Ki67 в качестве маркера клеточной пролиферации. Этот белок присутствует в пролиферирующих, но отсутствует в покоящихся клетках.

Из рис. 3.10 Б видно, что в пролиферирующих клетках фоновое число фокусов γH2AX ~ в 4 раза ($p<0,001$) выше, чем в покоящихся (2,74±0,11 и 0,68±0,11, соответственно). После облучения как в средней, так и в малой дозе в покоящихся клетках отмечалась сходная кинетика изменений числа фокусов γH2AX (рис. 3.10 Б, левая панель). Так через 4 часа после облучения в средней дозе (1000 мГр) оставалось 25,2±6,5 %, а через 24 ч 4,6±2,1 % фокусов от числа, зарегистрированного через 0,5 ч. Уже через 4 часа после облучения в малой дозе (80 мГр) абсолютное число фокусов γH2AX статистически значимо не отличалось от контрольных значений (рис. 3.8 Б, левая панель).

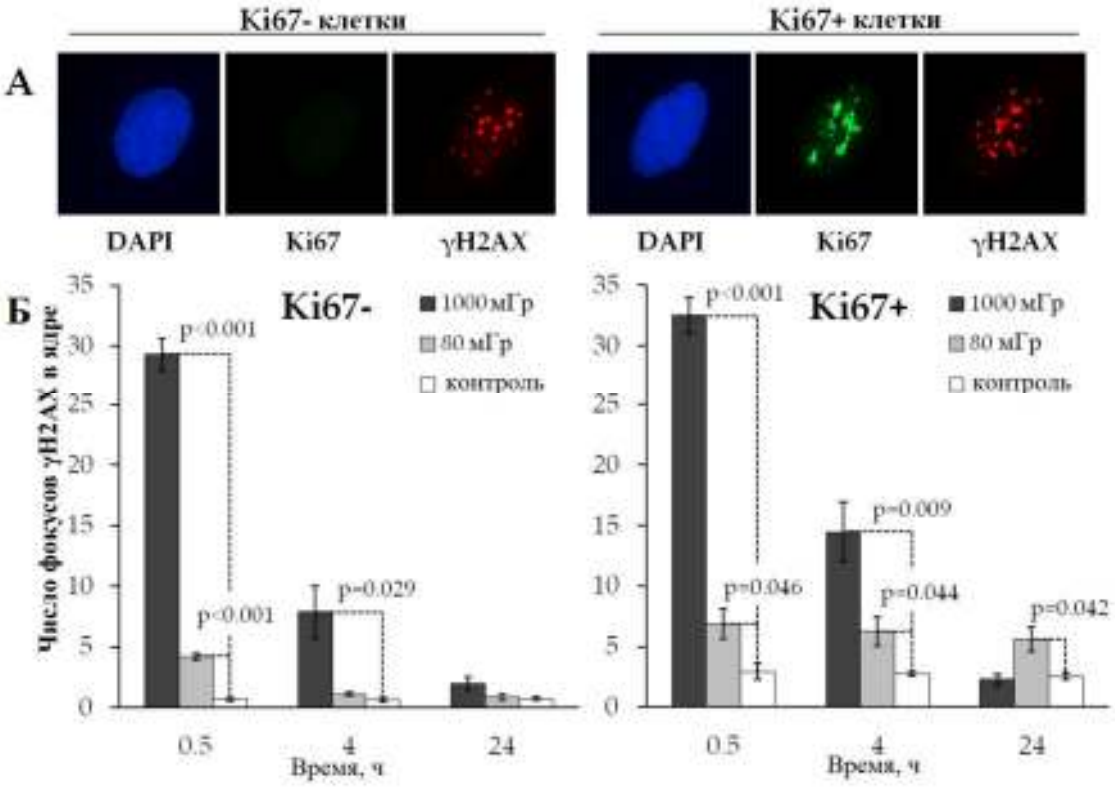


**Рисунок 3.10.** Иммуноцитохимический анализ фокусов γH2AX в покоящихся (Ki67-) и пролиферирующих (Ki67+) клетках. (**А**) Микрофотографии иммунофлуоресцентно окрашенных облученных МСК. Белок Ki67 – зеленый, фокусы γH2AX – красные. Ядра окрашены DAPI в синий цвет. (**Б**) Сравнительный анализ изменений числа фокусов в покоящихся и пролиферирующих клетках, облученных рентгеновским излучением в дозах 80 мГр и 1000 мГр.

В пролиферирующих клетках наблюдается иная картина. После облучения в малой дозе число фокусов γH2AX практически не меняется и даже через 24 ч остается статически значимо (p=0,042) выше контрольных значений (рис. 3.10 Б, правая панель). Таким образом, результаты исследований позволяют прийти к заключению о том, что длительное поддержание повышенного числа фокусов γH2AX после облучения в малой дозе связано с пролиферативной активностью клеток.

В отличие от 1000 мГр, где через 24 ч после облучения отмечается эффективное дефосфорилирование фокусов γH2AX, в ядрах клеток, облученных в дозе 80 мГр, наблюдались остаточные фокусы γH2AX, неколокализованные с pATM. Подобное явление отмечалось нами в предыдущей части нашей работы и, судя по всему, является характерным для малых доз. Эти «остаточные» фокусы γH2AX обнаруживаются преимущественно в пролиферирующих клетках. Учитывая данные особенности, можно предположить, что эти фокусы не являются результатом прямого радиационного повреждения ДНК, а скорее связаны с процессами репликации. Действительно, H2AX может подвергаться фосфорилированию во время ошибок репликации, таких как остановка вилки репликации, в этом случае фосфорилирование осуществляется ATR, а не ATM, [Ward I.M., 2001; Firsanov D.V., 2011]. Эти ошибки могут быть результатом повышенной генерации активных форм кислорода и азота, характерных для метаболизма S-фазы во время стимуляции пролиферации малыми дозами [Liang X., 2011; Kim C.S., 2007; Liang X., 2016]. В отличие от ДР ДНК, непосредственно индуцированных излучением (или продуктами радиолиза воды), ошибки репликации во время S-фазы обычно приводят к образованию длинных однонитевых участков ДНК и ДР ДНК, которые инициируют активацию киназы ATR и репарируются путем ГР [Kim K.P., 2017; Gelot C., 2015]. ГР является более медленным механизмом репарации ДНК по сравнению с НГСК. В то же время НГСК ответственен за репарацию около 80% радиационно-индуцированных ДР [Goodarzi A.A., 2010; Shibata A., 2014]. Поэтому мы полагаем, что в МСК человека облучение в малых дозах предпочтительно приводит к образованию повреждений ДНК в S-фазе и связано с активацией точного пути репарации по механизму ГР. Впоследствии именно этот процесс приводят к длительно-существующим pATM-независимым фокусам γH2AX, которые обычно именуют «остаточными» фокусами.

## *3.3 Отдаленные эффекты облучения*

### *3.3.1 Количественный анализ фокусов γH2AX в потомстве облученных клеток*

В предыдущих частях нашей работы было показано, что присутствие повышенного числа фокусов γH2AX через 24 ч после облучения в малых дозах МСК человека обусловлено их образованием *de novo.* При этом образующиеся ДР ДНК предположительно репарируются путем точного механизма ГР. Тем не менее, для оценки последствий облучения в малых дозах представлялось чрезвычайно важным изучить возможную трансгенерационную передачу повреждений ДНК или их генерацию *de novo* в потомках облученных клеток.

В ходе настоящей работы был проведен количественный анализ фокусов γH2AX на 3, 5, 8 и 11 клеточных пассажах после облучения МСК костного мозга человека.

При анализе результатов исследований, представленных на рис. 3.11, необходимо принимать во внимание, что облучение клеток проводилось на 3-м клеточном пассаже. Поэтому для подсчета клеточных пассажей с начала культивирования необходимо прибавить 3. Прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что на 11-м (14-м с начала культивирования) пассаже контрольных клеток число фокусов γH2AX ~ в 1,7 раза (p=0,022) выше, по сравнению с 3-м (6-м с начала культивирования) пассажем (рис. 3.11). Эти результаты хорошо согласуются с нашими предыдущими данными, полученными для длительно-культивируемых МСК десны. По всей видимости, увеличение числа фокусов γH2AX на поздних пассажах первичных нормальных (неиммортализованных и неопухолевых) клеточных культур тесно ассоциировано с процессами клеточного старения.

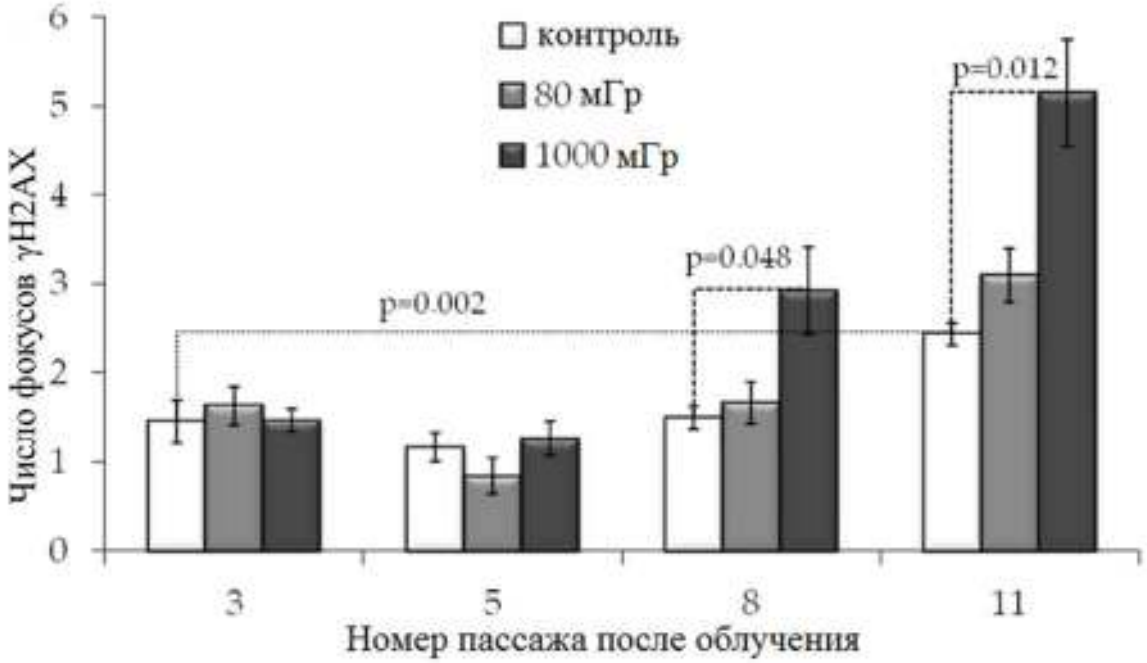


**Рисунок 3.11.** Изменение числа фокусов γH2AX в зависимости от клеточного пассажа в контрольных и облученных клетках.

Из рис. 3.11 видно, что на 3-м и 5-м пассажах в клетках, облученных в дозах 80 и 1000 мГр, не отмечается статистически значимых различий числа фокусов γH2AX по сравнению с контрольными клетками. Однако на 8-м и 11-м (11-м и 14-м с начала культивирования) пассажах потомков клеток, облученных в дозе 1000 мГр, отмечается статистически значимое ($p<0,05$) увеличение числа фокусов γH2AX (рис. 3.11). При этом число фокусов γH2AX в потомках клеток, облученных в дозе 80 мГр, статистически значимо не отличается от контрольных значений на соответствующих пассажах (рис. 3.11).

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что облучение в малой дозе (80 мГр), в отличие от облучения в средней дозе (1000 мГр), не приводит к увеличению числа фокусов γH2AX в потомках облученных клеток.

*3.3.2 Оценка пролиферативной активности в потомстве облученных клеток*

Одной из наиболее важных характеристик клеточной популяции, в особенности МСК, является пролиферативная активность. МСК, выделенные из различных источников, обладают различной пролиферативной активностью и ограниченным числом удвоения популяций, при достижении которого клетка вступает в репликативное старение [Koobatian M.T., 2015]. При старении клетка подвергается необратимой остановке клеточного цикла и, таким образом, теряет свою способность к делению. Повреждающие факторы, такие как ИИ, также могут приводить к остановке клеточного цикла и индукции преждевременного клеточного старения [Tchkonia T., 2013].

В ходе работы было проведено исследование изменений доли пролиферирующих (Ki67 позитивных) клеток при длительном культивировании контрольных и облученных клеток.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что на 11-м (14-м с начала культивирования) пассаже контрольной клеточной популяции отмечается статистически значимое (p=0,039) снижение доли Ki67 позитивных клеток ~ в 1,6 раз по сравнению с 3-м (6-м с начала культивирования) клеточным пассажем (рис. 3.12). В потомках клеток, облученных в дозе 1000 мГр, на 11 пассаже после облучения доля пролиферирующих клеток была статически значимо (p=0,043) ниже контрольного значения. В то время как в потомках клеток, облученных в дозе 80 мГр, не отмечалось статистически значимых изменений пролиферативной активности по сравнению с контрольными клетками на соответствующих пассажах (рис. 3.12).

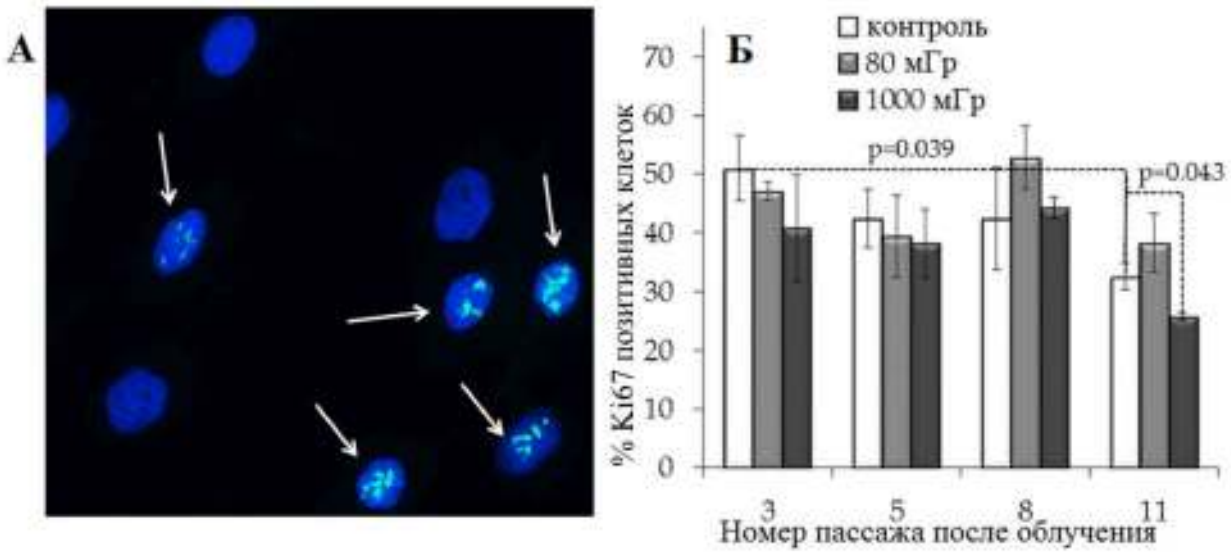


**Рисунок 3.12.** Иммуноцитохимический анализ пролиферативной активности клеток (Ki67+). (**А**) Микрофотография МСК, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к белку Ki67 (Ki67+ клетки указаны стрелками). (**Б**) Изменение клеточной пролиферации в зависимости от пассажа в контрольных и облученных МСК.

*3.3.3 Оценка клеточного старения в потомстве облученных клеток*

Во многих работах было показано, что МСК не подвергаются программируемой клеточной гибели путем апоптоза как после облучения в малых дозах [Alessio N., 2015], так и в больших дозах порядка 20 Гр [Nicolay N.H., 2013; Cmielova J., 2012]. Клеточное старение, напротив, повышается и, судя по всему, является основным механизмом, приводящим к снижению клеточной пролиферации после образования значительных повреждений генетического материала [Nicolay N.H., 2015].

Для оценки возможного влияния облучения на процессы клеточного старения в потомках облученных клеток был проведен анализ доли клеток с высокой активностью, ассоциированной со старением (Senescence-Associated) β-галактозидазы (SA-β-gal). Этот фермент традиционно считается

классическим маркером клеточного старения, его активность резко повышена в стареющих клетках.

Результаты исследований, представленные на рис. 3.13, показывают, что в популяции контрольных клеток с увеличением числа пассажей увеличивается доля SA-β-gal позитивных клеток. Так на 11-м пассаже (14-м с начала культивирования) доля SA-β-gal позитивных клеток была ~ в 2,1 раза выше (p=0,008) по сравнению с 3-м пассажем (6-м с начала культивирования). В потомках клеток, облученных в дозе 1000 мГр, отмечается процесс ускоренного радиационно-индуцированного старения, что хорошо заметно на 11-м пассаже после облучения (рис. 3.13 Б). Тогда как в потомках клеток, облученных в малой дозе, на поздних пассажах отмечается даже некоторая, хотя и статистически незначимая, тенденция к снижению доли SA-β-gal позитивных клеток (рис. 3.13 Б).

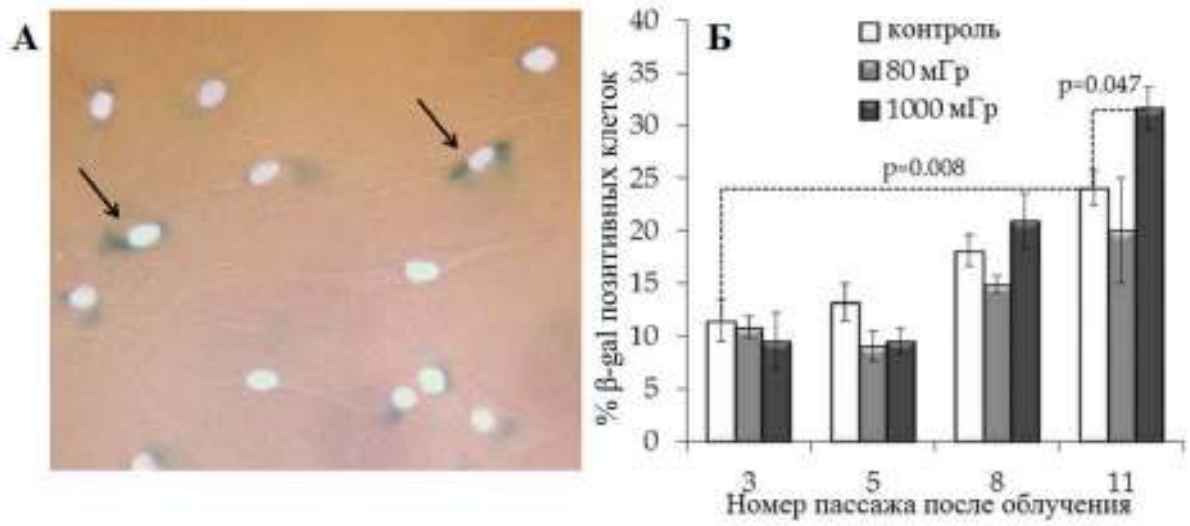


**Рисунок 3.13.** Анализ SA-β-gal позитивных клеток на различных пассажах в контрольных и облученных МСК. (**А**) Изображения SA-β-gal позитивных клеток (указаны стрелками – цитоплазма окрашена в темно-зеленый цвет). Ядра окрашены Hoechst 33342 (голубые). (**Б**) Изменение доли (%) SA-βgal позитивных клеток в зависимости от клеточного пассажа в контрольных и облученных клетках.

В самом деле, результаты исследований отдаленных эффектов облучения показали, что на 3 и 5 пассажах потомков клеток, облученных в дозах 80 и 1000 мГр, число фокусов γH2AX не отличается от контрольных значений. Это говорит о том, что, по крайней мере, после облучения в этих дозах в культурах МСК не наблюдается описанной в работе [Vaurijoux A., 2017] передачи длительно существующих фокусов γH2AX через клеточные деления. Наблюдаемое на 8 и 11 пассажах клеток, облученных в дозе 1000 мГр, увеличение числа фокусов γH2AX можно объяснить РИНГ или ускоренным старением клеток. Однако РИНГ наблюдается в основном в культурах иммортализованных или опухолевых клеток. В первичных культурах нормальных клеток существенный вклад в увеличение количества ДР ДНК вносит клеточное старение. В пользу данного предположения говорят результаты, полученные нами для длительно-культивируемых необлученных МСК десны, где на поздних пассажах наблюдается резкое увеличение числа фокусов γH2AX, ассоциированное со снижением пролиферативной активности, а в случае МСК костного мозга еще и с увеличением доли SA-βgal позитивных клеток. Можно предположить, что воздействие ионизирующего излучения в дозе 1000 мГр лишь интенсифицирует этот процесс. В пользу этого говорит и тот факт, что на 11 пострадиационном пассаже клеток, облученных в дозе 1000 мГр, увеличение числа фокусов γH2AX также сопровождалось снижением пролиферативной активности и увеличением доли SA-βgal позитивных клеток. Важно отметить, что облучение в дозе 80 мГр не приводило к статистически значимым изменениям исследуемых показателей в потомках облученных клеток в течение 11 пассажей после облучения. В целом полученные результаты позволяют сделать важное заключение о том, что облучение в малой дозе не индуцирует процессы ускоренного старения и РИНГ в потомках облученных клеток.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований были получены новые данные об особенностях формирования раннего и отдаленного отклика культивируемых МСК человека на воздействие ИИ в малых дозах. Показано, что низкая степень колокализации γH2AX и pATM в ранних временных сроках после облучения может быть связана с медленной активацией ATM, возникающей через 10-60 мин после образования повреждений ДНК. Ей, как полагают, предшествует очень ранняя (2-10 мин) активация DNA-PKcs, которая также является киназой, способной осуществлять фосфорилирование H2AX [Flassig R.J., 2014]. Обнаружено, что хотя воздействие рентгеновского излучения в малой дозе и вызывает феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γH2AX, эти фокусы не колокализованы с фокусами активной/фосфорилированной киназы ATM. Более того, присутствие повышенного числа фокусов γH2AX через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр наблюдалось только в пролиферирующих клетках. По всей видимости, феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γH2AX в пролиферирующих клетках, облученных в малой дозе, обусловлен не неэффективной репарацией первичных радиационно-индуцированных ДР ДНК, а образованием вторичных фокусов γH2AX.

Образование таких вторичных фокусов γH2AX может быть объяснено с позиции уже известных для облучения в малых дозах радиобиологических эффектов. В частности, одним из таких эффектов является «эффект свидетеля» («bystander effect»), выражающийся в проявлениях эффектов облучения в клетках, которые непосредственно не подвергались облучению. Показано, что образование ДР ДНК в этих клетках достигает максимальной величины между 12 и 48 ч [Sedelnikova O.A., 2007], что согласуется с полученными нами результатами. Считается, что повреждения ДНК в необлученных клетках возникают вследствие гипергенерации активных форм кислорода и азота [Jalal N., 2014; Yakovlev V.A., 2015]. Показано, что фокусы

γH2AX в таких клетках фосфорилируются киназой ATR и образуются преимущественно в S фазе клеточного цикла.

Другим эффектом облучения в малых дозах является описанная в различных работах стимуляция клеточной пролиферации, приводящая к увеличению доли клеток в S фазе. Повышенная генерация активных форм кислорода и азота, индуцирующих выход свободно-радикальных повреждений ДНК, приводит в S фазных клетках к коллапсу репликативных вилок. Образующиеся при этом ДР репарируются только по механизму ГР, а фосфорилирование гистона H2AX осуществляется преимущественно киназой ATR. В отличие от киназы ATM, активирующейся в ответ на образование ДР, ATR активируется в ответ на появление участков однонитевой ДНК, которые образуются в результате остановки или коллапса репликативных вилок и эксцизионной репарации нуклеотидов. По сравнению с некорректным, но быстрым механизмом НГСК, по которому репарируется ~ 80 % радиационно-индуцированных ДР ДНК, ГР является более корректным, но в то же время более медленным процессом. Поэтому вторичные фокусы γH2AX, возникающие в местах репарации репликативных ДР после облучения в малых дозах имеют большее время жизни, но, по всей видимости, не являются маркером критических для судьбы клетки и ее потомков повреждений ДНК.

В совокупности наши результаты по изучению ранних эффектов показывают, что остаточные фокусы γH2AX, наблюдаемые после облучения клеток в малых дозах, не являются результатом присутствия ДР ДНК, которые не могут воссоединиться. Они скорее представляют собой вторичные фокусы *de novo* образовавшиеся в пролиферирующих клетках во время репликации ДНК. Однако независимо от происхождения остаточных фокусов γH2AX, один из ключевых вопросов заключается в том, могут ли они представлять серьезную проблему в отношении долгосрочных последствий облучения в малых дозах ИИ. Поэтому мы проанализировали различные показатели, такие как число фокусов γH2AX, пролиферация и

старение в потомстве облученных клеток на 3, 5, 8 и 11 пассажах, соответствующих 21, 35, 56 и 77 дням культивирования. Мы показали, что клетки, подверженные воздействию ИИ в малой дозе, не отличались от контрольных необлученных клеток во всех исследованных временных точках для всех измеренных показателей, в отличие от клеток, облученных в дозе 1000 мГр рентгеновского излучения, где эффекты можно интерпретировать как пагубные. Таким образом, мы обнаружили более высокие значения числа фокусов γH2AX, снижение клеточной пролиферации и увеличение клеточного старения с увеличением номера клеточного пассажа в потомстве облученных в дозе 1000 мГр клеток.

Последствия воздействия ИИ связаны с рисками для здоровья. В настоящее время неопределенности, связанные с рисками здоровья представляют серьезную научную проблему, влияющую на многие сферы жизни человека. Сюда относится как радиологическая защита населения и работников атомной промышленности, так и защита пациентов, подвергающихся воздействию медицинских диагностических процедур, исследование космоса и др. Эффекты воздействия больших доз ИИ, в основном оцениваемые по риску возникновения радиационно-индуцированных злокачественных новообразований, не были однозначно подтверждены экспериментально для малых доз [Mitchel R.E., 2015]. Поскольку исследование заболеваемости раком в экспериментах на животных является чрезвычайно сложной задачей, были предприняты значительные усилия для поиска подходящих суррогатных маркеров мутагенности и канцерогенности для *in vitro* или *ex vivo* исследований с использованием клеток человека. В настоящее время к таким маркерам относятся дицентрические хромосомы [An Q., 2008], микроядра [Bertucci A., 2016] и фокусы γH2AX [Bonner W.M., 2008]. Однако пока неясно, являются ли они хорошими маркерами для прогнозирования отдаленных эффектов воздействия ИИ [Lee W.H., 2016]. Физиологические системные изменения, такие как репликативное клеточное старение или преждевременное старение,

могут обеспечить лучшую оценку отдаленных последствий, связанных с воздействием малых доз. Действительно, в какой-то степени рак является связанным со старением системным заболеванием, и многие пути, вовлеченные в старение и рак перекрываются [Peto J., 2001; Hoeijmakers J.H., 2009]. Вдобавок, было показано, что области тканей, имеющих высокие уровни клеточного старения в конечном итоге становятся фокальными областями канцерогенеза *in vivo*, обеспечивая прямую связь между старением и канцерогенезом. Полученные нами данные указывают на отсутствие отдаленных последствий, в том числе старения, после облучения МСК человека в малых дозах и предполагают, что остаточные фокусы γH2AX, наблюдающиеся через 24 ч после облучения, могут и не быть хорошим маркером для общей оценки отдаленных последствий облучения.

Важно заметить, что доза 80 мГр попадает в интервал доз, получаемых пациентами во время медицинских диагностических процедур, таких как КТ, которая часто сопровождает терапию с использованием стволовых клеток. Регенеративная медицина является стремительно развивающимся направлением, связанным с использованием стволовых клеток для лечения различных заболеваний. Поэтому полученные нами результаты представляют собой важные знания, которые могут быть использованы в медицине в отношении понимания рисков для здоровья, ассоциированных с воздействием малых доз ИИ на стволовые клетки человека.

В целом проведенные исследования свидетельствуют о том, что индуцированные рентгеновским излучением в дозе 80 мГр в культивируемых МСК человека ATM-независимые длительно существующие фокусы γH2AX связаны с клеточной пролиферацией и не приводят к отдаленным последствиям облучения, ассоциированным со старением (накопление фокусов γH2AX, увеличение доли SA-βgal позитивных клеток, пролиферативная активность). Мы заключаем, что точная интерпретация результатов, полученных при измерении количества фокусов γH2AX, может потребовать дополнительных анализов, таких как количественная оценка

фокусов pATM, клеточная пролиферация и старение, в течение длительных периодов времени. Необходимо подчеркнуть, что фокусы γH2AX в настоящее время активно используются для биодозиметрии радиационных воздействий. Непонимание биологической значимости остаточных фокусов может привести к существенной переоценке доз и риска облучения. Полученные результаты вносят важный вклад в понимание механизмов биологического ответа клеток человека на воздействие ионизирующего излучения в малых дозах.

# ВЫВОДЫ

1. В длительно культивируемых МСК на поздних (18-22) пассажах наблюдается статистически значимое ($p<0.01$) увеличение числа фокусов γH2AX ~ в 3 раза по сравнению с клетками на 3-8 пассажах.
2. В МСК, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в дозах 20-250 мГр в течение 60 мин после облучения отмечается линейно-зависимое от дозы увеличение числа фокусов γH2AX и фосфорилированного ATM. Фосфорилирование гистона H2AX в МСК в первые 10-60 мин после облучения является ATM-зависимым с максимумом на 30 мин.
3. Кинетика репарации ДР ДНК в клетках, подвергнутых облучению в малых и средних дозах ИИ, существенно различается: в отличие от эффективного дефосфорилирования γH2AX, наблюдавшегося после облучения в дозах 250 и 1000 мГр, после облучения в малых дозах (20, 40 и 80 мГр) наблюдается длительное (до 24 ч) присутствие повышенного числа фокусов γH2AX.
4. Обнаружено, что феномен длительного поддержания повышенного числа фокусов γH2AX в облученных малыми дозами ИИ МСК человека является ATM-независимым и характерен только для пролиферирующих клеток.
5. Облучение МСК в дозе 80 мГр не приводит к статистически значимому увеличению исследованных показателей (число фокусов γH2AX, доля Ki67+ клеток, доля β- галактозидаза позитивных клеток) в течение 11 пассажей после воздействия.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ATM (англ. ataxia telangiectasia mutated) — серин/треониновая протеинкиназа, мутация по которой вызывает заболевание - атаксия телеангиэктазия

ATR атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок

BDNF Нейротрофный фактор головного мозга

bFGF Основной фактор роста фибробластов

DDR Реакция на повреждение ДНК

DNA-PK ДНК-зависимая протеинкиназа

DNA-PKcs Каталитическая субъединица ДНК-ПК

ERK Экстраклеточно-регулируемая протеинкиназа

FBS Сыворотка эмбриональная телячья

GDNF Нейротрофный фактор глиальных клеток

HGF Фактор роста гепатоцитов

MAPK Митоген-активируемая протеинкиназа

NGF Фактор роста нервов

PARP-1 Поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1

SASP Ассоциированный со старением секреторный фенотип

SCF Фактор стволовых клеток

SDF-1a Фактор стромы-1а

VEGF Фактор роста сосудистого эндотелия

АФК Активные формы кислорода

ГР Гомологическая рекомбинация

ДНК Дезоксирибонуклеиновая кислота

ДР ДНК Двунитевые разрывы ДНК

ИИ Ионизирующее излучение

мРНК Матричная рибонуклеиновая кислота

МАП Мезенхимально-амебоидный переход

МСК Мезенхимальные стволовые клетки

НГСК Негомологичное соединение концов

ОСК Опухолевые стволовые клетки

РБА Репликативный белок А

РИНГ Радиационно-индуцированная нестабильность генома

СА-β-галактозидаза Ассоциированная со старением β-галактозидаза

ФИСК Родственное фосфоинозитол-3 киназам семейство киназ

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Газиев, А.И. Низкая эффективность репарации критических повреждений ДНК, вызываемых малыми дозами радиации / Газиев А.И. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 5. – С. 512–529.
2. Грехова, А.К. Замедленные процессы образования и деградации фокусов γH2AX в фибробластах кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых дозах / Грехова А.К., Еремин П.С., Осипов А.Н., Еремин И.И., Пустовалова М.В., Озеров И.В., Сметанина Н.М., Лазарева Н.Л., Воробьёва Н.Ю., Пулин А.А., Максимова О.А., Гордеев А.В., Бушманов А.Ю., Котенко К.В // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 395-401.
3. Еремин, П.С. Исследование эффективности применения аутологичных клеточных продуктов на основе жировой ткани для терапии тяжелых местных лучевых повреждений / Еремин П.С., Пигалева Н.А., Мурзабеков М.Б., Лебедев В.Г., Лазарева Н.Л., Еремин И.И., Пулин А.А., Осипов А.Н., Бушманов А.Ю., Котенко К.В. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 838–844.
4. Калинина, Н.И. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / Калинина Н.И., Сысоева В.Ю., Рубина К.А., Парфенова Е.В., Ткачук В.А. // Acta naturae. – 2011. – Т. 3, № 4. – С. 32-39.
5. Калмыкова, Н.В. Терапевтическое действие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток после радиационного воздействия / Калмыкова Н.В., Александрова С.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – Т. 56, № 2. – С. 117-137.
6. Котеров, А.Н. Радиационно индуцированная нестабильность генома при действии малых доз радиации в научных публикациях и в документах международных организаций / Котеров А.Н. //

Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2009. – Т. 54, № 4. – С. 5-13.

7. Манских, В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / Манских В. Н. // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909-915.
8. Москалёва, Е.Ю. Влияние облучения на мезенхимальные стволовые клетки костного и головного мозга мыши и их способность индуцировать опухоли / Москалёва Е.Ю., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т. 57, № 3. – С. 245–256
9. Москалева, Е.Ю. Характеристика опухолей, развившихся у мышей после введения сингенных облученных мезенхимных стволовых клеток костного мозга / Москалева Е.Ю., Жорова Е.С., Семочкина Ю.П., Родина А.В., Высоцкая О.В., Глухов А.И., Чукалова А.А., Посыпанова Г.А., Сапрыкин В.П. // Цитология. – 2017. – Т. 59, № 4. – С. 271-278.
10. Осипова, Е.Ю. Динамика скорости роста, иммунофенотипа и генетическая стабильность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека на ранних и поздних пассажах при культивировании ex vivo / Осипова Е.Ю., Никитина В.А., Астрелина Т.А., Устюгов А.Ю., Дмитриева Е.В., Пурбуева Б.Б., Скоробогатова Е.В., Шаманская Т.В., Дышлевая З.М., Яковлева М.В., Майорова О.А., Катосова Л.Д., Румянцев С.А., Бочков Н.П. // Онкогематология. – 2009. – Т. 1. – С. 44-50.
11. Пантелеев, М.А. Физиология и патология внеклеточных везикул / Пантелеев М.А., Абаева А.А., Нечипуренко Д.Ю., Обыденный С.И., Свешникова А.Н., Шибеко А.М. // Онкогематология. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 62-70.
12. Пелевина, И.И. Молекулярные и клеточные последствия аварии на ЧАЭС/ Пелевина И.И., Афанасьев Г.Г., Алещенко А.В., Антощина М.М., Готлиб В.Я., Конрадов А.А., Кудряшова О.В., Лизунова Е.Ю.,

Осипов А.Н., Рябченко Н.И., Серебряный А.М. // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2011. – Т. 51, № 1. – С. 154-161.

13. Посыпанова, Г. А. Действие малых и сублетальных доз γ-излучения на мезенхимальные и нейральные стволовые клетки из головного мозга мыши / Посыпанова Г.А., Москалёва Е.Ю., Родина А.В., Сёмочкина Ю.П., Ратушняк М.Г., Перевозчикова В.Г.// Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – Т. 56, № 1. – С. 35-43.
14. Рябченко, Н.Н. Радиационно-индуцированная нестабильность генома человека / Рябченко Н.Н., Демина Э.А. // Problems of radiation medicine and radiobiology. – 2014. № 9. – С. 48–58
15. Abarbanell, A.M. Proinflammatory cytokine effects on mesenchymal stem cell therapy for the ischemic heart / Abarbanell A.M , Coffey A.C., Fehrenbacher J.W., Beckman D.J., Herrmann J.L., Weil B., Meldrum D.R. // Ann Thorac Surg. – 2009. – V. 88, № 3. – P. 1036-1043.
16. Abreu, S.C., Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? / Abreu S.C., Weiss D.J., Rocco P.R. // Stem Cell Res Ther. – 2016. – V. 7, № 1. – P. 1-52.
17. Alessio, N. Mesenchymal stromal cells having inactivated RB1 survive following low irradiation and accumulate damaged DNA: Hints for side effects following radiotherapy / Alessio N., Capasso S., Di Bernardo G., Cappabianca S., Casale F., Calarco A., Cipollaro M., Peluso G., Galderisi U. // Cell Cycle. – 2017. – V. 16, № 3. – P. 251-258.
18. Alessio, N. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process / Alessio N., Del Gaudio S., Capasso S., Di Bernardo G., Cappabianca S., Cipollaro M., Peluso G., Galderisi U. // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 10. – P. 8155-8166.
19. Alessio, N. Irradiation of Mesenchymal Stromal Cells With Low and High Doses of Alpha Particles Induces Senescence and/or Apoptosis / Alessio N., Esposito G., Galano G., De Rosa R., Anello P., Peluso G., Tabocchini M.A., Galderisi U. // J Cell Biochem. – 2017. – V. 118, № 9. – P. 2993-3002.

20. Alves, H. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells / Alves H., Munoz-Najar U., De Wit J., Renard A.J., Hoeijmakers J.H., Sedivy J.M., Van Blitterswijk C., De Boer J. // J Cell Mol Med. – 2010. – V. 14, № 12. – P. 2729-2738.
21. An, Q. Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer/ An Q., Wright S.L., Konn Z.J., Matheson E., Minto L., Moorman A.V., Parker H., Griffiths M., Ross F.M., Davies T., Hall A.G., Harrison C.J., Irving J.A., Strefford J.C. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – V. 105, № 44. – P. 17050-17054.
22. Antonelli, F. Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death / Antonelli F., Campa A., Esposito G., Giardullo P., Belli M., Dini V., Meschini S., Simone G., Sorrentino E. Gerardi S., Cirrone G. A., Tabocchini M. A. // Radiat Res. – 2015. – V. 183, № 4. – P. 417-431.
23. Aparicio, T. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer / Aparicio T., Baer R., Gautier J. // DNA Repair (Amst). – 2014. – V. 19. – P. 169-175.
24. Bakkenist, C.J DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation / Bakkenist C.J., Kastan M.B. // Nature. – 2003. – V. 421, № 6922. – P. 499-506.
25. Banfi, A. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy / Banfi A., Muraglia A., Dozin B., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Quarto R. // Exp Hematol. – 2000. – V. 28, № 6. – P. 707-715.
26. Barkholt, L. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints / Barkholt L., Flory E., Jekerle V., Lucas-Samuel S., Ahnert P., Bisset L.,

Buscher D., Fibbe W., Foussat A., Kwa M., Lantz O., Maciulaitis R., Palomaki T., Schneider C. K., Sensebe L., Tachdjian G., Tarte K., Tosca L., Salmikangas P. // Cytotherapy. – 2013. – V. 15, № 7. – P. 753-759.

27. Basu-Roy, U. Perspectives on cancer stem cells in osteosarcoma / Basu-Roy U., Basilico C., Mansukhani A. // Cancer Lett. – 2013. – V. 338, № 1. – P. 158-167.
28. Beckermann, B.M. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma / Beckermann B.M., Kallifatidis G., Groth A., Frommhold D., Apel A., Mattern J., Salnikov A.V., Moldenhauer G., Wagner W., Diehlmann A., Saffrich R., Schubert M., Ho A.D., Giese N., Buchler M.W., Friess H., Buchler P., Herr I. // Br J Cancer. – 2008. – V. 99, № 4. – P. 622-631.
29. Berrington de Gonzalez, A. Relationship between paediatric CT scans and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: assessment of the impact of underlying conditions / Berrington de Gonzalez A., Salotti J.A., McHugh K., Little M.P., Harbron R.W., Lee C., Ntowe E., Braganza M.Z., Parker L., Rajaraman P., Stiller C., Stewart D.R., Craft A.W., Pearce M.S. // Br J Cancer. – 2016. – V. 114, № 4. – P. 388-394.
30. Bertucci, A. In vitro RABiT measurement of dose rate effects on radiation induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes / Bertucci A., Smilenov L.B., Turner H.C., Amundson S.A., Brenner D.J. // Radiat Environ Biophys. – 2016. – V. 55, № 1. – P. 53-59.
31. Bianco, P. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays / Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J. // Cell Stem Cell. – 2008. – V. 2, № 4. – P. 313-319.
32. Bohgaki, T. DNA double-strand break signaling and human disorders / Bohgaki T., Bohgaki M., Hakem R. // Genome Integr. – 2010. – V. 1, № 1. – P. 1-14.

33. Bonner, W.M. GammaH2AX and cancer / Bonner W.M., Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J., Sedelnikova O.A., Solier S., Pommier Y. // Nat Rev Cancer. – 2008. – V. 8, № 12. – P. 957-967.
34. Braidy, N. Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats / Braidy N., Guillemin G.J., Mansour H., Chan-Ling T., Poljak A., Grant R. // PLoS One. – 2011. – V. 6, № 4. – e19194.
35. Burma, S. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks / Burma S., Chen B.P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D.J. // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, № 45. – P. 42462-42467.
36. Capasso, S. Changes in autophagy, proteasome activity and metabolism to determine a specific signature for acute and chronic senescent mesenchymal stromal cells / Capasso S., Alessio N., Squillaro T., Di Bernardo G., Melone M.A., Cipollaro M., Peluso G., Galderisi U.// Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 37. – P. 39457-39468.
37. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells/ Caplan A. I. // J Orthop Res. – 1991. – V. 9, № 5. – P. 641-650.
38. Carbajal, K.S. Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis / Carbajal K.S., Schaumburg C., Strieter R., Kane J., Lane T.E. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – V. 107, № 24. – P. 11068-11073.
39. Caron, P Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks / Caron P., Choudjaye J., Clouaire T., Bugler B., Daburon V., Aguirrebengoa M., Mangeat T., Iacovoni J.S., Alvarez-Quilon A., Cortes-Ledesma F., Legube G. // Cell Rep. – 2015. – V. 13, № 8. – P. 1598-1609.
40. Chan, C.K. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell / Chan C.K., Seo E.Y., Chen J.Y., Lo D., McArdle A., Sinha R., Tevlin R., Seita J., Vincent-Tompkins J., Wearda T., Lu W.J., Senarath-Yapa K., Chung M.T., Marecic O., Tran M., Yan K.S., Upton R., Walmsley G.G., Lee

A.S., Sahoo D., Kuo C.J., Weissman I.L., Longaker M. T. // Cell. – 2015. – V. 160, № 1-2. – P. 285-298.

41. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / Chance B., Sies H., Boveris A. // Physiol Rev. – 1979. – V. 59, № 3. – P. 527-605.
42. Chang, H.H.Y. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair / Chang H.H.Y., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2017. – V. 18, № 8. – C. 495-506.
43. Chen, X. St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome P. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma / Chen X., Bahrami A., Pappo A., Easton J., Dalton J., Hedlund E., Ellison D., Shurtleff S., Wu G., Wei L., Parker M., Rusch M., Nagahawatte P., Wu J., Mao S., Boggs K., Mulder H., Yergeau D., Lu C., Ding L., Edmonson M., Qu C., Wang J., Li Y., Navid F., Daw N. C., Mardis E. R., Wilson R. K., Downing J. R., Zhang J., Dyer M. A. // Cell Rep. – 2014. – V. 7, № 1. – P. 104-112.
44. Christensen, R. Transformation of human mesenchymal stem cells in radiation carcinogenesis: long-term effect of ionizing radiation / Christensen R., Alsner J., Brandt Sorensen F., Dagnaes-Hansen F., Kolvraa S., Serakinci N. // Regen Med. – 2008. – V. 3, № 6. – P. 849-861.
45. Cleton-Jansen, A.M. Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumourigenic pathways/ Cleton-Jansen A.M., Anninga J.K., Briaire-de Bruijn I.H., Romeo S., Oosting J., Egeler R.M., Gelderblom H., Taminiau A.H., Hogendoorn P.C. // Br J Cancer. – 2009. – V. 101, № 11. – P. 1909-1918.
46. Cmielova, J. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments / Cmielova J., Havelek R., Soukup T., Jiroutova A., Visek B., Suchanek J., Vavrova J., Mokry J., Muthna D., Bruckova L., Filip S., English D., Rezacova M. // Int J Radiat Biol. – 2012. – V. 88, № 5. – P. 393-404.

47. Coppe, J.P. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen / Coppe J.P., Patil C.K., Rodier F., Krtolica A., Beausejour C.M., Parrinello S., Hodgson J.G., Chin K., Desprez P.Y., Campisi J. // PLoS One. – 2010. – V. 5, № 2. – e9188.
48. Coppe, J.P. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor / Coppe J.P. // PLoS Biol. – 2008. – V. 6, № 12. – P. 2853-2868.
49. Cortez, D. Preventing replication fork collapse to maintain genome integrity / Coppe J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Munoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J. // DNA Repair (Amst). – 2015. – V. 32. – P. 149-157.
50. Costes, S.V. Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization / Costes S.V., Chiolo I., Pluth J.M., Barcellos-Hoff M.H., Jakob B. // Mutat Res. – 2010. – V. 704, № 1-3. – P. 78-87.
51. Cottarel, J. A noncatalytic function of the ligation complex during nonhomologous end joining / Cottarel J., Frit P., Bombarde O., Salles B., Negrel A., Bernard S., Jeggo P. A., Lieber M. R., Modesti M., Calsou P. // J Cell Biol. – 2013. – V. 200, № 2. – P. 173-186.
52. Darzynkiewicz, Z. When senescence masquerades as DNA damage: is DNA replication stress the culprit? / Darzynkiewicz Z. // Cell Cycle. – 2009. – V. 8, № 23. – P. 3810-3811.
53. Dasari, V.R. Cord blood stem cell-mediated induction of apoptosis in glioma downregulates X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) / Dasari V.R., Velpula K.K., Kaur K., Fassett D., Klopfenstein J.D., Dinh D.H., Gujrati M., Rao J.S. // PLoS One. – 2010. – V. 5, № 7. – e11813.
54. Dickey, J.S. H2AX phosphorylation in response to DNA double-strand break formation during bystander signalling: effect of microRNA knockdown / Dickey J.S., Zemp F.J., Altamirano A., Sedelnikova O.A.,

Bonner W.M., Kovalchuk O. // Radiat Prot Dosimetry. – 2011. – V. 143, № 2-4. – P. 264-269.

55. Dimri, G.P. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo / Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1995. – V. 92, № 20. – P. 9363-9367.
56. Dwyer, R.M. Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells / Dwyer R.M., Potter-Beirne S.M., Harrington K.A., Lowery A.J., Hennessy E., Murphy J. M., Barry F.P., O'Brien T., Kerin M.J. // Clin Cancer Res. – 2007. – V. 13, № 17. – P. 5020-5027.
57. Feng, H. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote colorectal cancer cell death under low-dose irradiation / Feng H., Zhao J.K., Schiergens T.S., Wang P.X., Ou B.C., Al-Sayegh R., Li M.L., Lu A.G., Yin S., Thasler W.E. // Br J Cancer. – 2018. – V. 118, № 3. – P. 353-365.
58. Feng, Z. Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations / Feng Z., Hu W., Teresky A.K., Hernando E., Cordon-Cardo C., Levine A.J. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – V. 104, № 42. – P. 16633-16638.
59. Firsanov, D.V. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues / Firsanov D.V., Solovjeva L.V., Svetlova M.P. // Clin Epigenetics. – 2011. – V. 2, № 2. – P. 283-297.
60. Flassig, R.J. Experimental design, validation and computational modeling uncover DNA damage sensing by DNA-PK and ATM / Flassig R.J., Maubach G., Tager C., Sundmacher K., Naumann M. // Mol Biosyst. – 2014. – V. 10, № 7. – P. 1978-1986.
61. Fujishiro, A. Effects of acute exposure to low-dose radiation on the characteristics of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells / Fujishiro A., Miura Y., Iwasa M., Fujii S., Sugino N., Andoh A., Hirai H., Maekawa T., Ichinohe T. // Inflamm Regen. – 2017. – V. 37. – P. 19.

62. Fumagalli, M. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation / Fumagalli M., Rossiello F., Clerici M., Barozzi S., Cittaro D., Kaplunov J. M., Bucci G., Dobreva M., Matti V., Beausejour C.M., Herbig U., Longhese M.P., d'Adda di Fagagna F. // Nat Cell Biol. – 2012. – V. 14, № 4. – P. 355-365.
63. Gao, S. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model / Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan Z. // Radiat Environ Biophys. – 2017. – V. 56, № 1. – P. 63-77.
64. Garzotto, D. Hepatocyte growth factor regulates migration of olfactory interneuron precursors in the rostral migratory stream through Met-Grb2 coupling / Garzotto D., Giacobini P., Crepaldi T., Fasolo A., De Marchis S. // J Neurosci. – 2008. – V. 28, № 23. – P. 5901-5909.
65. Geissler, S. Functional comparison of chronological and in vitro aging: differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells / Geissler S., Textor M., Kuhnisch J., Konnig D., Klein O., Ode A., Pfitzner T., Adjaye J., Kasper G., Duda G. N.// PLoS One. – 2012. – V. 7, № 12. – e52700.
66. Gelot, C. Replication stress in Mammalian cells and its consequences for mitosis / Gelot C., Magdalou I., Lopez B. S. // Genes (Basel). – 2015. – V. 6, № 2. – P. 267-298.
67. Gewirtz, D.A. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition / Gewirtz D.A. // Autophagy. – 2013. – V. 9, № 5. – P. 808-812.
68. Gibson, D.A. The disproportionate risk burden of CT scanning on females and younger adults in Australia: a retrospective cohort study / Gibson D.A., Moorin R.E., Semmens J., Holman D.J. // Aust N Z J Public Health. – 2014. – V. 38, № 5. – P. 441-448.
69. Gong, W. Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury / Gong W., Guo M., Han Z., Wang Y.,

Yang P., Xu C., Wang Q., Du L., Li Q., Zhao H., Fan F., Liu Q. // Cell Death Dis. – 2016. – V. 7, № 9. – e2387.

70. Goodarzi, A.A. The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax / Goodarzi A.A., Jeggo P., Lobrich M. // DNA Repair (Amst). – 2010. – V. 9, № 12. – P. 1273-1282.

71. Gottlieb, T.M. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen / Gottlieb T.M., Jackson S.P. // Cell. – 1993. – V. 72, № 1. – P. 131-142.

72. Groesser, T. Persistence of gamma-H2AX and 53BP1 foci in proliferating and non-proliferating human mammary epithelial cells after exposure to gamma-rays or iron ions / Groesser T., Chang H., Fontenay G., Chen J., Costes S. V., Helen Barcellos-Hoff M., Parvin B., Rydberg B. // Int J Radiat Biol. – 2011. – V. 87, № 7. – P. 696-710.

73. Grudzenski, S. Inducible response required for repair of low-dose radiation damage in human fibroblasts / Grudzenski S., Raths A., Conrad S., Rube C. E., Lobrich M. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – V. 107, № 32. – P. 14205-14210.

74. Guo, W. Y. Acceleration of diabetic wound healing by low-dose radiation is associated with peripheral mobilization of bone marrow stem cells / Grudzenski S., Wang G. J., Wang P., Chen Q., Tan Y., Cai L. // Radiat Res. – 2010. – V. 174, № 4. – P. 467-479.

75. Harfouche, G. Response of normal stem cells to ionizing radiation: a balance between homeostasis and genomic stability / Harfouche G., Martin M. T. // Mutat Res. – 2010. – V. 704, № 1-3. – P. 167-174.

76. Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains / Hayflick L. // Exp Cell Res. – 1965. – V. 37. – P. 614-636.

77. Hematti, P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? / Hematti P. // Cytotherapy. – 2012. – V. 14, № 5. – P. 516-521.

78. Hewitt, G. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence / Hewitt G., Jurk D., Marques F.D., Correia-Melo C., Hardy T., Gackowska A., Anderson R., Taschuk M., Mann J., Passos J.F. // Nat Commun. – 2012. – V. 3. – P. 708.
79. Hoeijmakers, J. H. DNA damage, aging, and cancer / Hoeijmakers J. H. // N Engl J Med. – 2009. – V. 361, № 15. – P. 1475-1485.
80. Hofig, I. p53-Dependent Senescence in Mesenchymal Stem Cells under Chronic Normoxia Is Potentiated by Low-Dose gamma-Irradiation / Hofig I., Ingawale Y., Atkinson M.J., Hertlein H., Nelson P.J., Rosemann M. // Stem Cells Int. – 2016. – V. 2016. – 1-12.
81. Hwang, E.S. Senescence suppressors: their practical importance in replicative lifespan extension in stem cells / Hwang E.S. // Cell Mol Life Sci. – 2014. – V. 71, № 21. – P. 4207-4219.
82. Iliakis, G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence / Iliakis G. // Radiother Oncol. – 2009. – V. 92, № 3. – P. 310-315.
83. Jalal, N. Radiation induced bystander effect and DNA damage / Jalal N., Haq S., Anwar N., Nazeer S., Saeed U. // J Cancer Res Ther. – 2014. – V. 10, № 4. – P. 819-833.
84. Kakarougkas, A DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism / Kakarougkas A., Jeggo P.A. // Br J Radiol. – 2014. – V. 87, № 1035. – P. 1-8.
85. Keshtkar, S. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine / Keshtkar S., Azarpira N., Ghahremani M. H. // Stem Cell Res Ther. – 2018. – V. 9, № 1. – P. 1-62.
86. Kidd, S. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging / Kidd S., Spaeth E., Dembinski J.L., Dietrich M., Watson K., Klopp A., Battula V. L., Weil M., Andreeff M., Marini F.C. // Stem Cells. – 2009. – V. 27, № 10. – P. 2614-2623.

87. Kim, C.S. Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt / Kim C.S., Kim J.K., Nam S.Y., Yang K H., Jeong M., Kim H.S., Kim C.S., Jin Y.W., Kim J. // Mol Cells. – 2007. – V. 24, № 3. – P. 424-430.
88. Kim, G.J. A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating radiation-induced genomic instability / Kim G. J., Fiskum G. M., Morgan W. F. // Cancer Res. – 2006. – V. 66, № 21. – P. 10377-10383.
89. Kim, K.P. So similar yet so different: The two ends of a double strand break / Kim K.P., Mirkin E.V. // Mutat Res. – 2018. – V. 809 – P. 70-80.
90. Kinner, A. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin / Kinner A., WuW., Staudt C., Iliakis G. // Nucleic Acids Res. – 2008. – V. 36, № 17. – P. 5678-5694.
91. Konno, M. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture / Konno M., Hamazaki T.S., Fukuda S., Tokuhara M., Uchiyama H., Okazawa H., Okochi H., Asashima M. // Biochem Biophys Res Commun. – 2010. – V. 400, № 4. – P. 461-465.
92. Koobatian, M.T. Differential effects of culture senescence and mechanical stimulation on the proliferation and leiomyogenic differentiation of MSC from different sources: implications for engineering vascular grafts / Koobatian M.T., Liang M.S., Swartz D.D., Andreadis S.T. // Tissue Eng Part A. – 2015. – V. 21, № 7-8. – P. 1364-1375.
93. Kotenko, K.V. Changes in the number of double-strand DNA breaks in Chinese hamster V79 cells exposed to gamma-radiation with different dose rates / 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. // Int J Mol Sci. – 2013. – V. 14, № 7. – P. 13719-13726.
94. Krille, L. Computed tomographies and cancer risk in children: a literature overview of CT practices, risk estimations and an epidemiologic cohort study proposal / Krille L., Zeeb H., Jahnen A., Mildenberger P.,

Seidenbusch M., Schneider K., Weisser G., Hammer G., Scholz P., Blettner M. // Radiat Environ Biophys. – 2012. – V. 51, № 2. – P. 103-111.

95. Kumar, R. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease / Kumar R., Sharma A., Pattnaik A. K., Varadwaj P. K. // J Nat Sci Biol Med. – 2010. – V. 1, № 1. – P. 43-52.

96. Kuo, L.J., Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks / Kuo L. J., Yang L. X. // In Vivo. – 2008. – V. 22, № 3. – P. 305-309.

97. Lapidot, T. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice / Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., Murdoch B., Hoang T., Caceres-Cortes J., Minden M., Paterson B., Caligiuri M. A., Dick J. E. // Nature. – 1994. – V. 367, № 6464. – P. 645-648.

98. Lee, H.K. Preclinical efficacy and mechanisms of mesenchymal stem cells in animal models of autoimmune diseases / Lee H.K., Lim S.H., Chung I.S., Park Y., Park M.J., Kim J.Y., Kim Y G., Hong J.T., Kim Y., Han S.B. // Immune Netw. – 2014. – V. 14, № 2. – P. 81-88.

99. Lee, J.H. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks / Lee J.H., Paull T.T. // Oncogene. – 2007. – V. 26, № 56. – P. 7741-7748.

100. Lee, J.H. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex / Lee J.H., Paull T.T. // Science. – 2005. – V. 308, № 5721. – P. 551-554.

101. Lee, W.H. DNA damage-associated biomarkers in studying individual sensitivity to low-dose radiation from cardiovascular imaging / Lee W.H., Nguyen P.K., Fleischmann D., Wu J.C. // Eur Heart J. – 2016. – V. 37, № 40. – P. 3075-3080.

102. Lemon, J.A. Multiple CT Scans Extend Lifespan by Delaying Cancer Progression in Cancer-Prone Mice / Lemon J.A., Phan N., Boreham D.R. // Radiat Res. – 2017. – V. 188, № 4.2. – P. 495-504.

103. Lemon, J.A. Single CT Scan Prolongs Survival by Extending Cancer Latency in Trp53 Heterozygous Mice / Lemon J.A., Phan N., Boreham D.R. // Radiat Res. – 2017. – V. 188, № 4.2. – P. 505-511.

104. Liang, X. Low-Dose Radiation Induces Cell Proliferation in Human Embryonic Lung Fibroblasts but not in Lung Cancer Cells: Importance of ERK1/2 and AKT Signaling Pathways / Liang X., Gu J., Yu D., Wang G., Zhou L., Zhang X., Zhao Y., Chen X., Zheng S., Liu Q., Cai L., Cui J., Li W. // Dose Response. – 2016. – V. 14, № 1. – P 1-10.

105. Liang, X. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells / Liang X., So Y. H., Cui J., Ma K., Xu X., Zhao Y., Cai L., Li W. // J Radiat Res. – 2011. – V. 52, № 3. – P. 380-386.

106. Lieber, M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway/ Lieber M.R. // Annu Rev Biochem. – 2010. – V. 79. – P. 181-211.

107. Liu, B. Chromatin remodeling, DNA damage repair and aging / Liu B., Yip R., Zhou Z. // Curr Genomics. – 2012. – V. 13, № 7. – P. 533-547.

108. Lobrich, M. GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization / Lobrich M., Shibata A., Beucher A., Fisher A., Ensminger M., Goodarzi A. A., Barton O., Jeggo P. A. // Cell Cycle. – 2010. – V. 9, № 4. – P. 662-669.

109. Loebinger, M.R. Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles / Loebinger M.R., Kyrtatos P.G., Turmaine M., Price A.N., Pankhurst Q., Lythgoe M.F., Janes S.M.// Cancer Res. – 2009. – V. 69, № 23. – P. 8862-8867.

110. MacRae, S.L. DNA repair in species with extreme lifespan differences / MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A., Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., Zhang Z.D., Vijg J. // Aging (Albany NY). – 2015. – V. 7, № 12. – P. 1171-1184.

111. Mamouni, K. RhoB promotes gammaH2AX dephosphorylation and DNA double-strand break repair /Mamouni K., Cristini A., Guirouilh-Barbat J., Monferran S., Lemarie A., Faye J. C., Lopez B. S., Favre G., Sordet O. // Mol Cell Biol. – 2014. – V. 34, № 16. – P. 3144-3155.

112. Manda, K. Low dose effects of ionizing radiation on normal tissue stem cells / Manda K., Kavanagh J.N., Buttler D., Prise K. M., Hildebrandt G. // Mutat Res Rev Mutat Res. – 2014–V. 76 1– P. 6-14 .

113. Marechal, A. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases / Marechal A., Zou L. // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2013. – V. 5, № 9 – P. 1-17.

114. Mariotti, L.G. Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures / Mariotti L.G., Pirovano G., Savage K.I., Ghita M., Ottolenghi A., Prise K.M., Schettino G. // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 11. – e79541.

115. Meirelles, Lda S. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells / Meirelles Lda S., Nardi N. B. // Front Biosci (Landmark Ed). – 2009. – V. 14. – P. 4281-4298.

116. Menendez, J.A. Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): accelerating the onset of stress-induced senescence to boost protection against cancer / Menendez J.A., Cufi S., Oliveras-Ferraros C., Martin-Castillo B., Joven J., Vellon L., Vazquez-Martin A. // Aging (Albany NY). – 2011. – V. 3, № 11. – P. 1063-1077.

117. Menon, L.G. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells / Menon L.G., Picinich S., Koneru R., Gao H., Lin S. Y., Koneru M., Mayer-Kuckuk P., Glod J., Banerjee D. // Stem Cells. – 2007. – V. 25, № 2. – P. 520-528.

118. Mitchel, R.E. Adaption By Low Dose Radiation Exposure: A Look at Scope and Limitations for Radioprotection / Mitchel R.E. // Dose Response. – 2015. – V. 13, № 1 –P. 1-7.

119. Mladenov, E. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy / Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G. // Front Oncol. – 2013. – V. 3. – P. 1-18.

120. Mladenov, E. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation/ Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G. // Semin Cancer Biol. – 2016. – V. 37-38. – P. 51-64.

121. Moehrle, B.M. Aging of hematopoietic stem cells: DNA damage and mutations? / Moehrle B.M., Geiger H. // Exp Hematol. – 2016. – V. 44, № 10. – P. 895-901.

122. Morgan, W.F. Issues in low dose radiation biology: the controversy continues. A perspective / Morgan W.F., Bair W.J. // Radiat Res. – 2013. – V. 179, № 5. – P. 501-510.

123. Morgan, W.F. Non-targeted effects induced by ionizing radiation: mechanisms and potential impact on radiation induced health effects / Morgan W F., Sowa M.B. // Cancer Lett. – 2015. – V. 356, № 1. – P. 17-21.

124. Morikawa, S. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest / Morikawa S., ., Mabuchi Y., Niibe K., Suzuki S., Nagoshi N., Sunabori T., Shimmura S., Nagai Y., Nakagawa T., Okano H., Matsuzaki Y. // Biochem Biophys Res Commun. – 2009. – V. 379, № 4. – P. 1114-1119.

125. Mothersill, C. Radiation-induced bystander effects - implications for cancer / Mothersill C., Seymour C.B. // Nat Rev Cancer. – 2004. – V. 4, № 2. – P. 158-164.

126. Neumaier, T. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells / Neumaier T., Swenson J., Pham C., Polyzos A., Lo A.T., Yang P., Dyball J., Asaithamby A., Chen D.J., Bissell M.J., Thalhammer S., Costes S.V. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – V. 109, № 2. – P. 443-448.

127. Nicolay, N.H. Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic / Nicolay N.H., Lopez Perez R., Saffrich R., Huber P.E. // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 23. – P. 19366-19380.

128. Nicolay, N.H. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation / Nicolay N.H., Sommer E., Lopez R., Wirkner U., Trinh T., Sisombath S., Debus J., Ho A.D., Saffrich R., Huber P.E. // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 2013. – V. 87, № 5. – P. 1171-1178.

129. Nomoto-Kojima, N. Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro / Nomoto-Kojima N., Aoki S., Uchihashi K., Matsunobu A., Koike E., Ootani A., Yonemitsu N., Fujimoto K., Toda S. // Cell Tissue Res. – 2011. – V. 344, № 2. – P. 287-298.

130. Osipov, A.N. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells / Osipov A.N., Pustovalova M., Grekhova A., Eremin P., Vorobyova N., Pulin A., Zhavoronkov A., Roumiantsev S., Klokov D.Y., Eremin I. // Oncotarget. – 2015. – V. 6, № 29. – P. 27275-27287.

131. Ostrowski, M. Low-dose computed tomography screening reduces lung cancer mortality / Ostrowski M., Marjanski T., Rzyman W. // Adv Med Sci. – 2018. – V. 63, № 2. – P. 230-236.

132. Patel, S.A. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta / Patel S. A., Meyer J.R., Greco S.J., Corcoran K.E., Bryan M., Rameshwar P. // J Immunol. – 2010. – V. 184, № 10. – P. 5885-5894.

133. Pearce, M.S. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study / Pearce M.S., Salotti J.A., Little M.P., McHugh K., Lee C., Kim K.P., Howe N.L., Ronckers C.M., Rajaraman P., Sir Craft A.W., Parker L.,

Berrington de Gonzalez A. // Lancet. – 2012. – V. 380, № 9840. – P. 499-505.

134. Pellegrini, L. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex / Pellegrini L., Yu D. S., Lo T., Anand S., Lee M., Blundell T.L., Venkitaraman A.R. // Nature. – 2002. – V. 420, № 6913. – P. 287-293.

135. Perez, J.R. Tracking of Mesenchymal Stem Cells with Fluorescence Endomicroscopy Imaging in Radiotherapy-Induced Lung Injury / Perez J.R., Ybarra N., Chagnon F., Serban M., Lee S., Seuntjens J., Lesur O., El Naqa I. // Sci Rep. – 2017. – V. 7. – P. 1-9.

136. Peto, J. Genetics and the common cancers / Peto J., Houlston R.S. // Eur J Cancer. – 2001. – V. 37 Suppl 8. – P. 88-96.

137. Pietrovito, L. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote invasiveness and transendothelial migration of osteosarcoma cells via a mesenchymal to amoeboid transition / Pietrovito L., Leo A., Gori V., Lulli M., Parri M., Becherucci V., Piccini L., Bambi F., Taddei M. L., Chiarugi P. // Mol Oncol. – 2018 – V.12, №5. – P.659-676.

138. Pospelova, T.V. Pseudo-DNA damage response in senescent cells / Pospelova T.V., Demidenko Z.N., Bukreeva E.I., Pospelov V.A., Gudkov A. V., Blagosklonny M.V. // Cell Cycle. – 2009. – V. 8, № 24. – P. 4112-4118.

139. Pustovalova, M. Characteristics of spontaneous γH2AX foci accumulation in long- term cultured human mesenchymal stem cells / Pustovalova M., Grekhova A., Osipov A. // FEBS Journal. – 2017. – V. 284, № P.1.2-007. – P. 110-111.

140. Pustovalova, M. ATM-dependent histone H2AX phosphorylation in human gingival mesenchymal stem cells exposed to X-ray radiation at low and intermediate doses / Pustovalova M., Grekhova. A., Vorobyova N., Osipov A. // Abstracts 62nd Annual International Meeting Radiation Research Society –2016. – P. 409-410.

141. Pustovalova, M., Residual gammaH2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells / Pustovalova M., Astrelina T., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., Nikitina V., Suchkova Y., Usupzhanova D., Brunchukov V., Kobzeva I., Karaseva capital Te C., Ozerov I. V., Samoylov A., Bushmanov A., Leonov S., Izumchenko E., Zhavoronkov A., Klokov D., Osipov A. N. // Aging (Albany NY). – 2017. – V. 9, № 11. – P. 2397-2410.

142. Pustovalova, M. Accumulation of spontaneous gammaH2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells / Pustovalova M., Grekhova A., Astrelina T., Nikitina V., Dobrovolskaya E., Suchkova Y., Kobzeva I., Usupzhanova D., Vorobyeva N., Samoylov A., Bushmanov A., Ozerov I. V., Zhavoronkov A., Leonov S., Klokov D., Osipov A. N. // Aging (Albany NY). – 2016. – V. 8, № 12. – P. 3498-3506.

143. Ramachandran, C. Multidrug resistance in human tumors--molecular diagnosis and clinical significance / Ramachandran C., Melnick S. J. // Mol Diagn. – 1999. – V. 4, № 2. – P. 81-94.

144. Redon, C.E. Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker / Redon C.E., Nakamura A.J., Martin O.A., Parekh P.R., Weyemi U.S., Bonner W.M. // Aging (Albany NY). – 2011. – V. 3, № 2. – P. 168-174.

145. Redon, C.E. Gamma-H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic / Redon C.E., Weyemi U., Parekh P.R., Huang D., Burrell A.S., Bonner W.M. // Biochim Biophys Acta. – 2012. – V. 1819, № 7. – P. 743-756.

146. Reitsema, T. DNA-PK is responsible for enhanced phosphorylation of histone H2AX under hypertonic conditions / Reitsema T., Klokov D., Banath J. P., Olive P. L. // DNA Repair (Amst). – 2005. – V. 4, № 10. – P. 1172-1181.

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

148. Rogakou, E.P. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo / Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. // J Cell Biol. – 1999. – V. 146, № 5. – P. 905-916.

149. Rogakou, E.P. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 / Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. // J Biol Chem. – 1998. – V. 273, № 10. – P. 5858-5868.

150. Roos, W.P. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis / Roos W.P., Kaina B. // Cancer Lett. – 2013. – V. 332, № 2. – P. 237-248.

151. Rothkamm, K. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses / Rothkamm K., Lobrich M. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100, № 9. – P. 5057-5062.

152. Saleh-Gohari, N. Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks / Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N., Parker K.M., Cassel T.N., Helleday T. // Mol Cell Biol. – 2005. – V. 25, № 16. – P. 7158-7169.

153. Sasportas, L.S. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy / Sasportas L.S., Kasmieh R., Wakimoto H., Hingtgen S., van de Water J.A., Mohapatra G., Figueiredo J.L., Martuza R.L., Weissleder R., Shah K. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – V. 106, № 12. – P. 4822-4827.

154. Schmidt, N.O. Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche / Schmidt N.O., Koeder D., Messing M., Mueller

F.J., Aboody K.S., Kim S.U., Black P.M., Carroll R.S., Westphal M., Lamszus K. // Brain Res. – 2009. – V. 1268. – P. 24-37.

155. Sedelnikova, O.A. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks / Sedelnikova O.A., Horikawa I., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Bonner W.M., Barrett J.C. // Nat Cell Biol. – 2004. – V. 6, № 2. – P. 168-170.

156. Sedelnikova, O.A. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models / Sedelnikova O.A., Nakamura A., Kovalchuk O., Koturbash I., Mitchell S. A., Marino S.A., Brenner D.J., Bonner W.M. // Cancer Res. – 2007. – V. 67, № 9. – P. 4295-4302.

157. Sell, S. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers / Sell S., Pierce G.B. // Lab Invest. – 1994. – V. 70, № 1. – P. 6-22.

158. Shibata, A. DNA double-strand break repair in a cellular context / Shibata A., Jeggo P.A. // Clin Oncol (R Coll Radiol). – 2014. – V. 26, № 5. – P. 243-249.

159. Shimura, T. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1 / Shimura T., Kunugita N. // Cell Cycle. – 2016. – V. 15, № 11. – P. 1410-1414.

160. Siddiqui, M.S. Persistent gammaH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging / Siddiqui M. S., Francois M., Fenech M.F., Leifert W.R. // Mutat Res Rev Mutat Res. – 2015. – V. 766. – P. 1-19.

161. Singh, S. Mesenchymal stem cells show radioresistance in vivo / Singh S., Kloss F.R., Brunauer R., Schimke M., Jamnig A., Greiderer-Kleinlercher B., Klima G., Rentenberger J., Auberger T., Hachl O., Rasse M., Gassner R., Lepperdinger G. // J Cell Mol Med. – 2012. – V. 16, № 4. – P. 877-887.

162. Sirbu, B.M. Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks / Sirbu B.M., Couch F.B., Feigerle J.T., Bhaskara S.,

Hiebert S.W., Cortez D. // Genes Dev. – 2011. – V. 25, № 12. – P. 1320-1327.

163. Skoda, J. Cancer stem cell markers in pediatric sarcomas: Sox2 is associated with tumorigenicity in immunodeficient mice / Skoda J., Nunukova A., Loja T., Zambo I., Neradil J., Mudry P., Zitterbart K., Hermanova M., Hampl A., Sterba J., Veselska R. // Tumour Biol. – 2016. – V. 37, № 7. – P. 9535-9548.

164. So, S. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites / So S., Davis A.J., Chen D.J. // J Cell Biol. – 2009. – V. 187, № 7. – P. 977-990.

165. Son, B.R. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases / Son B.R., Marquez-Curtis L.A., Kucia M., Wysoczynski M., Turner A.R., Ratajczak J., Ratajczak M.Z., Janowska-Wieczorek A. // Stem Cells. – 2006. – V. 24, № 5. – P. 1254-1264.

166. Soni, A. Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining / Soni A., Siemann M., Grabos M., Murmann T., Pantelias G.E., Iliakis G. // Nucleic Acids Res. – 2014. – V. 42, № 10. – P. 6380-6392.

167. Spagnolo, L. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair / Spagnolo L., Rivera-Calzada A., Pearl L.H., Llorca O. // Mol Cell. – 2006. – V. 22, № 4. – P. 511-519.

168. Stiff, T. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation / Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Lobrich M., Jeggo P.A. // Cancer Res. – 2004. – V. 64, № 7. – P. 2390-2396.

169. Studencka, M. Senoptosis: non-lethal DNA cleavage as a route to deep senescence / Studencka M., Schaber J.// Oncotarget. – 2017. – V. 8, № 19. – P. 30656-30671.

170. Sugihara, T. Increased gamma-H2A.X intensity in response to chronic medium-dose-rate gamma-ray irradiation / Sugihara T., Murano H., Tanaka K. // PLoS One. – 2012. – V. 7, № 9. – e45320.

171. Sukup-Jackson, M. RRosa26-GFP direct repeat (RaDR-GFP) mice reveal tissue- and age-dependence of homologous recombination in mammals in vivo / Sukup-Jackson M. R., Kiraly O., Kay J. E., Na L., Rowland E.A., Winther K.E., Chow D.N., Kimoto T., Matsuguchi T., Jonnalagadda V.S., Maklakova V.I., Singh V.R., Wadduwage D.N., Rajapakse J., So P.T., Collier L.S., Engelward B.P. // PLoS Genet. – 2014. – V. 10, № 6. – e1004299.

172. Sun, L. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury / Sun L., Lee J., Fine H.A. // J Clin Invest. – 2004. – V. 113, № 9. – P. 1364-1374.

173. Sutherland, B.M. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation / Sutherland B.M., Bennett P.V., Sidorkina O., Laval J. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – V. 97, № 1. – P. 103-108.

174. Symington, L.S. Double-strand break end resection and repair pathway choice / Symington L.S., Gautier J. // Annu Rev Genet. – 2011. – V. 45. – P. 247-271.

175. Szatmari, T. Extracellular Vesicles Mediate Radiation-Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen / Szatmari T., Kis D., Bogdandi E.N., Benedek A., Bright S., Bowler D., Persa E., Kis E., Balogh A., Naszalyi L.N., Kadhim M., Safrany G., Lumniczky K. // Front Immunol. – 2017. – V. 8. – P. 1-20.

176. Taleei, R. DSB repair model for mammalian cells in early S and G1 phases of the cell cycle: application to damage induced by ionizing radiation of

different quality / Taleei R., Girard P. M., Nikjoo H. // Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. – 2015. – V. 779. – P. 5-14.

177. Taran, S.J. Pediatric Osteosarcoma: An Updated Review / Taran S.J., Taran R., Malipatil N.B. // Indian J Med Paediatr Oncol. – 2017. – V. 38, № 1. – P. 33-43.

178. Tchkonia, T. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities / Tchkonia T., Zhu Y., van Deursen J., Campisi J., Kirkland J. L. // J Clin Invest. – 2013. – V. 123, № 3. – P. 966-972.

179. Thrasher, P. Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase: Role in Myocardial Remodeling / Thrasher P., Singh M., Singh K. // J Rare Dis Res Treat. – 2017. – V. 2, № 1. – P. 32-37.

180. Tobin, L.A. Targeting abnormal DNA double-strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias / Tobin L.A., Robert C., Rapoport A.P., Gojo I., Baer M.R., Tomkinson A.E., Rassool F.V. // Oncogene. – 2013. – V. 32, № 14. – P. 1784-1793.

181. Trachana, V. Human mesenchymal stem cells with enhanced telomerase activity acquire resistance against oxidative stress-induced genomic damage / Trachana V., Petrakis S., Fotiadis Z., Siska E.K., Balis V., Gonos E.S., Kaloyianni M., Koliakos G. // Cytotherapy. – 2017. – V. 19, № 7. – P. 808-820.

182. Tseng, B.P. Characterizing low dose and dose rate effects in rodent and human neural stem cells exposed to proton and gamma irradiation / Tseng B.P., Lan M.L., Tran K.K., Acharya M.M., Giedzinski E., Limoli C.L. // Redox Biol. – 2013. – V. 1. – P. 153-162.

183. Tsvetkova, A. GammaH2AX, 53BP1 and Rad51 protein foci changes in mesenchymal stem cells during prolonged X-ray irradiation / Tsvetkova A., Ozerov I.V., Pustovalova M., Grekhova A., Eremin P., Vorobyeva N., Eremin I., Pulin A., Zorin V., Kopnin P., Leonov S., Zhavoronkov A., Klokov D., Osipov A. N. // Oncotarget. – 2017. – V. 8, № 38. – P. 64317-64329.

184. Tu, W.Z. GammaH2AX foci formation in the absence of DNA damage: mitotic H2AX phosphorylation is mediated by the DNA-PKcs/CHK2 pathway / Tu W.Z., Li B., Huang B., Wang Y., Liu X.D., Guan H., Zhang S.M., Tang Y., Rang W.Q., Zhou P.K. // FEBS Lett. – 2013. – V. 587, № 21. – P. 3437-3443.

185. Ullah, I. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective / Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. // Biosci Rep. – 2015. – V. 35, № 2 – P. 1-18.

186. United Nations UNSCEAR 2012.Report to the General Assembly with Scientific Annexes. Scientific Annexes A and B. Annex A. Attributing health effects to ionizing radiation exposure and inferring risks. Annex B. Uncertainties in risk estimates for radiation-induced cancer // New York. – 2015.

187. Uselmann, A.J. On effective dose for radiotherapy based on doses to nontarget organs and tissues / Uselmann A.J., Thomadsen B.R. // Med Phys. – 2015. – V. 42, № 2. – P. 977-982.

188. Vaidya, A. Knock-in reporter mice demonstrate that DNA repair by non-homologous end joining declines with age/ Vaidya A., Mao Z., Tian X., Spencer B., Seluanov A., Gorbunova V. // PLoS Genet. – 2014. – V. 10, № 7. – e1004511.

189. Vallabhaneni, K.C. Mesenchymal Stem/Stromal Cells under Stress Increase Osteosarcoma Migration and Apoptosis Resistance via Extracellular Vesicle Mediated Communication / Vallabhaneni K.C., Hassler M.Y., Abraham A., Whitt J., Mo Y.Y., Atfi A., Pochampally R. // PLoS One. – 2016. – V. 11, № 11. – e0166027.

190. van Gent, D.C. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection / van Gent D.C., Hoeijmakers J.H., Kanaar R. // Nat Rev Genet. – 2001. – V. 2, № 3. – P. 196-206

191. Vaurijoux, A. Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells / Vaurijoux A., Voisin P.,

Freneau A., Barquinero J.F., Gruel G. // Mutat Res. – 2017. – V. 797-799. – P. 15-25.

192. Vilenchik, M.M. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer / Vilenchik M.M., Knudson A.G. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100, № 22. – P. 12871-12876.

193. von Zglinicki, T. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases / von Zglinicki T., Martin-Ruiz C.M. // Curr Mol Med. – 2005. – V. 5, № 2. – P. 197-203.

194. Wang, J.Y. Generation of Osteosarcomas from a Combination of Rb Silencing and c-Myc Overexpression in Human Mesenchymal Stem Cells / Wang J.Y., Wu P.K., Chen P.C., Lee C.W., Chen W.M., Hung S.C. // Stem Cells Transl Med. – 2017. – V. 6, № 2. – P. 512-526.

195. Wang, M. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways / Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 34, № 21. – P. 6170-6182.

196. Wang, Y. Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases / Wang Y., Boerma M., Zhou D. // Radiat Res. – 2016. – V. 186, № 2. – P. 153-161.

197. Wang, Y. Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases / Wang Y., Yu X., Chen E., Li L. // Stem Cell Res Ther. – 2016. – V. 7, № 1. – P. 1-8.

198. Ward, I.M. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress / Ward I. M., Chen J. // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, № 51. – P. 47759-47762.

199. White, R.R. Controlled induction of DNA double-strand breaks in the mouse liver induces features of tissue ageing / White R.R., Milholland B., de Bruin A., Curran S., Laberge R.M., van Steeg H., Campisi J., Maslov A.Y., Vijg J. // Nat Commun. – 2015. – V. 6. – e6790.

200. White, R.R. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: an in vivo repair mechanism utilized by multiple somatic tissues in mammals / White R.R., Sung P., Vestal C.G., Benedetto G., Cornelio N., Richardson C. // PLoS One. – 2013. – V. 8, № 12. – e84379.

201. Wu, P.K. Early Passage Mesenchymal Stem Cells Display Decreased Radiosensitivity and Increased DNA Repair Activity / Wu P.K., Wang J.Y., Chen C.F., Chao K.Y., Chang M.C., Chen W.M., Hung S.C. // Stem Cells Transl Med. – 2017. – V. 6, № 6. – P. 1504-1514.

202. Xiao, W. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis / Xiao W., Mohseny A.B., Hogendoorn P.C., Cleton-Jansen A.M. // Clin Sarcoma Res. – 2013. – V. 3, № 1. – P. 1-9.

203. Xu, W.T. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis / Xu W.T., Bian Z.Y., Fan Q.M., Li G., Tang T.T. // Cancer Lett. – 2009. – V. 281, № 1. – P. 32-41.

204. Yakovlev, V.A. Role of nitric oxide in the radiation-induced bystander effect / Yakovlev V.A. // Redox Biol. – 2015. – V. 6. – P. 396-400.

205. Yang, L. Low-dose radiation modulates human mesenchymal stem cell proliferation through regulating CDK and Rb / Yang L., Liu Z., Chen C., Cong X., Li Z., Zhao S., Ren M. // Am J Transl Res. – 2017. – V. 9, № 4. – P. 1914-1921.

206. Zambetti, N.A. Mesenchymal Inflammation Drives Genotoxic Stress in Hematopoietic Stem Cells and Predicts Disease Evolution in Human Pre-leukemia / Zambetti N.A., Ping Z., Chen S., Kenswil K.J.G., Mylona M.A., Sanders M.A., Hoogenboezem R.M., Bindels E.M.J., Adisty M.N., Van Strien P.M.H., van der Leije C.S., Westers T.M., Cremers E.M.P., Milanese C., Mastroberardino P.G., van Leeuwen J., van der Eerden B.C.J., Touw I.P., Kuijpers T.W., Kanaar R., van de Loosdrecht A.A., Vogl T., Raaijmakers M. // Cell Stem Cell. – 2016. – V. 19, № 5. – P. 613-627.

207. Zeman, M.K., Causes and consequences of replication stress / Zeman M.K., Cimprich K.A. // Nat Cell Biol. – 2014. – V. 16, № 1. – P. 2-9.

208. Zhao, J. pATM and gammaH2AX are effective radiation biomarkers in assessing the radiosensitivity of (12)C(6+) in human tumor cells / Zhao J., Guo Z., Pei S., Song L., Wang C., Ma J., Jin L., Ma Y., He R., Zhong J., Ma Y., Zhang H. // Cancer Cell Int. – 2017. – V. 17. – P. 1-48.

209. Zhou, B.B. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective / Zhou B.B., Elledge S. J. // Nature. – 2000. – V. 408, № 6811. – P. 433-439.

210. Zhu, Y. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1 / Zhu Y., Sun Z., Han Q., Liao L., Wang J., Bian C., Li J., Yan X., Liu Y., Shao C., Zhao R. C. // Leukemia. – 2009. – V. 23, № 5. – P. 925-933.

211. Zischek, C. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma / Zischek C., Niess H., Ischenko I., Conrad C., Huss R., Jauch K. W., Nelson P. J., Bruns C. // Ann Surg. – 2009. – V. 250, № 5. – P. 747-753.

212. Zuk, P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. // Tissue Eng. – 2001. – V. 7, № 2. – P. 211-228.

# БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность своему научному руководителю Осипову А.Н. за огромный вклад, который он внес в создание и написание данной работы. Также благодарю коллектив лаборатории радиационной биофизики ФМБЦ им. А.И. Бурназяна и, в особенности, Грехову А.К., моего бессменного напарника в проведении лабораторных исследований, за помощь в осуществлении экспериментальной части и моральную поддержку. Кроме того, хочу выразить признательность Максимовой О.А. за помощь в облучении клеток, а также Астрелину Т.А. и ее сотрудников за предоставление клеточных культур.

Отдельной благодарности заслуживают мои родные и близкие за оказываемую поддержку. Без их участия выполнение данной работы было бы невозможным.