

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2018

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

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

Москалева Елизавета Юрьевна – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Замулаева Ирина Александровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом радиационной биохимии и лабораторией пострадиационного восстановления Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «20» сентября 2018 г. в 12 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 462.001.04

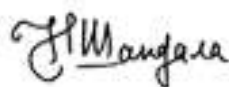
Адрес: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46,

Тел. +7 (495)190-96-98

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Автореферат разослан « ___ » _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

 Шандала Н.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. В то же время в клинической практике клеточная терапия нередко сопровождается различными рентгеновскими диагностическими процедурами, во время которых происходит облучение тканей в малых дозах. 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].

Ионизирующее излучение (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. 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, среди которых наиболее критическими для дальнейшей судьбы клетки являются двунитевые разрывы (ДР) [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 настоящее время наиболее чувствительным методом для оценки ДР ДНК является иммуноцитохимический анализ фокусов белков репарации ДНК, среди которых наиболее широкое использование получил анализ фосфорилированного корового гистона H2AX (γ H2AX) [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].

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.

Научная новизна. Впервые были получены оригинальные данные о характере изменений количества и колокализации фокусов γ H2AX и фокусов активной, фосфорилированной киназы АТМ (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 γ H2AX 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 γ H2AX, 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 γ H2AX 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 исследований чрезвычайно важны для адекватной оценки опасности облучения в малых дозах. Использование количественного анализа фокусов γ H2AX в биодозиметрии может приводить к значительной переоценке доз и риска облучения и требует дополнительных исследований.

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.

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 γ H2AX в облученных в малых дозах рентгеновского излучения МСК человека является АТМ-независимым;
- 3) воздействие рентгеновского излучения в малых дозах не приводит к отдаленным последствиям облучения, ассоциированным с накоплением ДР ДНК и клеточным старением.

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.

Апробация работы проведена на расширенном заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. 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 и XXIII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. Москва, 2017 и 2018 гг.; 42-м конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS), г. Иерусалим, Израиль, 2017 г.; школе-конференции "Ильинские чтения", Москва, 2018 г.

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

Структура и объем 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 .

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный следующим вопросам: 1) основные характеристики МСК человека и области их применения в клеточной терапии; 2) роль и место ДР среди повреждений ДНК; 3) основные механизмы репарации ДР ДНК и их роль в судьбе клетки; 4) особенности воздействия ИИ в малых дозах на МСК (репарация ДР ДНК, пролиферация, старение, радиационно-индуцированная нестабильность генома, канцерогенез).

Из анализа литературы следует, что до сих пор отклик МСК на воздействие ИИ в малых дозах вызывает немало противоречий. В то же время МСК используются в регенеративной медицине и ответственны за способность тканей к пострadiационному восстановлению. Изучение данного вопроса особенно важно на фоне повсеместного использования рентгеновских диагностических процедур, во время которых происходит облучение тканей в малых дозах (до 100 мГр).

Особый акцент сделан на анализе работ, посвященных изучению критических повреждений ДНК, определяющих судьбу клетки, ДР ДНК. Проводится краткое описание основных механизмов репарации ДР ДНК: гомологической рекомбинации (ГР) и негомологичного соединения концов (НГСК). Большое внимание уделено обзору литературных данных по проявлению таких клеточных эффектов в ответ на воздействие ИИ в малых дозах, как: репарация ДР ДНК, пролиферация, старение, нестабильность генома, канцерогенез.

Глава 2. Материалы и методы.

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток.

Эксперименты были выполнены на культурах МСК, выделенных из биоптатов слизистой десны здоровых добровольцев (5 женщин 26-32 лет) и культуре МСК костного мозга полученной от здорового добровольца (мужчина, 37 лет). На проведение исследования было получено разрешение локального этического комитета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России (№ 5А/12.02.2016). Культивирование МСК слизистой десны проводили в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (Stem Cell, США) с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллин, стрептомицин), 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Stem Cell, США) в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37°C, 5% CO₂, абсолютная влажность). Культивирование МСК костного мозга проводили в среде MesenCult™ MSC Basal Medium with supplement (StemCell™ Technologies, Канада) с добавлением 1% антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) (Sigma-Aldrich, США) в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37°C, 5% CO₂, абсолютная влажность). Клетки пассировали каждые 7 дней. Для иммуноцитохимического окрашивания клетки пассировали на стерильные покровные стекла в чашках Петри (d=33 мм. Corning, США) в 500 мкл клеточной суспензии из расчета 5x10³ кл/см². Для адгезии клеток на стеклах, рабочую среду (1,5 мл) добавляли через 15 минут. Инкубация перед облучением проводилась в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в течение 20 часов.

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°C (для охлаждения использовались термогранулы LAB ARMOR BEADS). Погрешность отпускаемой дозы не превышала 15 %. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях CO₂ инкубатора (37°C, 5% CO₂).

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). Пермеабилizировали 0,3 % Тритон-Х100 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 γ H2AX (Merck-Millipore, США) в разведении 1/200, мышинные моноклональные антитела к фосфорилированному белку ATM (Merck-Millipore, США) в разведении 1/400, мышинные 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 фотоблещивания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold (Life Technologies, США).

Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония), оснащенном видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия) 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.

Анализ количества β-галактозидаза позитивных клеток. Подсчет количества β-галактозидаза позитивных клеток был проведен с использованием коммерческого набора для оценки клеточного старения «Cellular Senescence Assay Kit» (EMD Millipore, США). Окраска проводилась согласно протоколу производителя. На конечном этапе окраски была использована небольшая модификация: 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 Corp., Канада) CCD и 20x объективом с использованием фильтров возбуждения/эмиссии (CKX-U: 340-380нм/435-485 нм).

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

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

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 aberrаций, 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 свидетельствуют 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. 1 А).

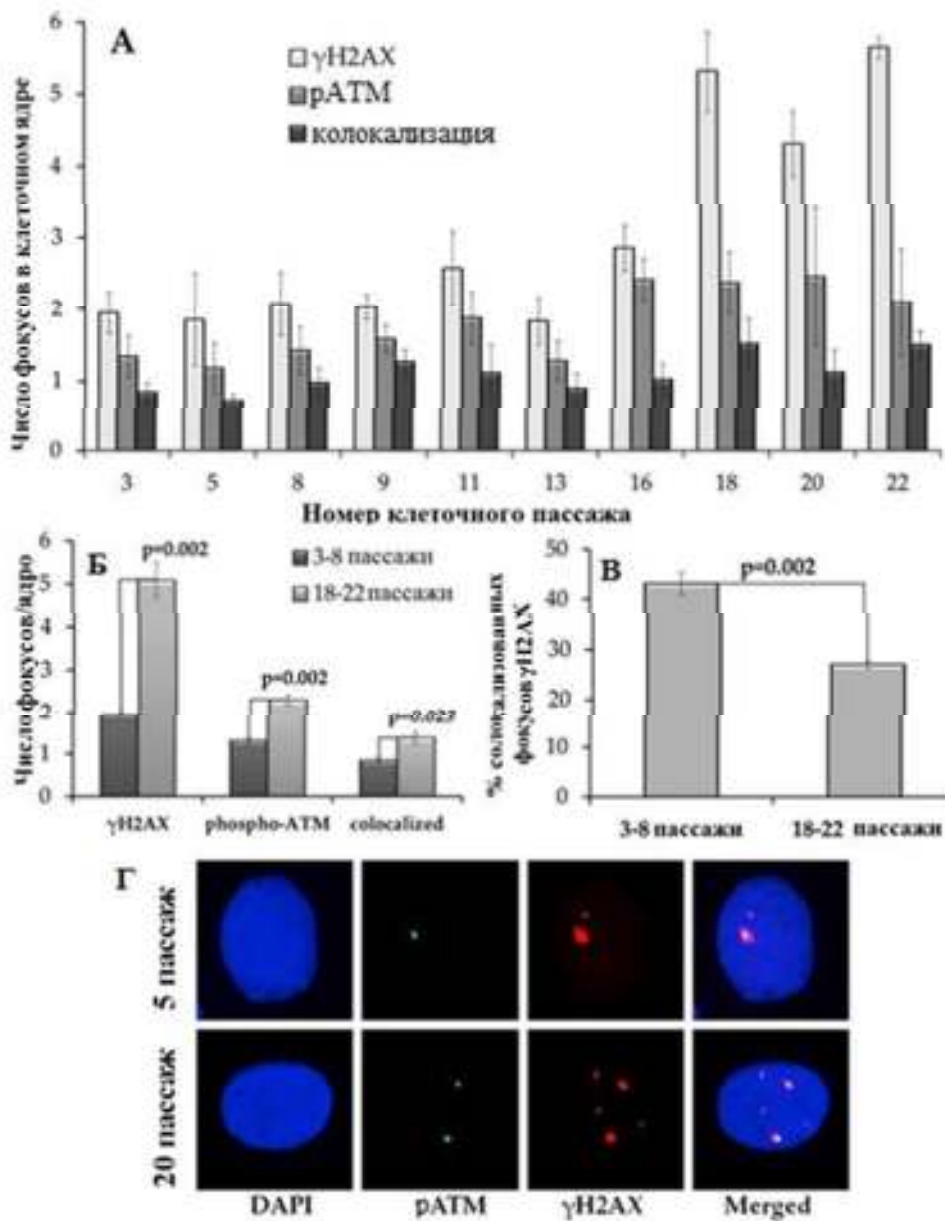


Рисунок 1. Иммуноцитохимический анализ фокусов γ H2AX и pATM. (А) изменения числа фокусов γ H2AX, pATM и их колокализации на 3-22 клеточных пассажах; (Б) сравнительный анализ γ H2AX, pATM и их колокализации на ранних (3-8) и поздних (18-22) клеточных пассажах; (В) относительное количество (%) фокусов γ H2AX, 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 γ H2AX, соответственно.

В отличие от γ H2AX, число фокусов pATM увеличивается практически монотонно с увеличением числа клеточных пассажей (рис. 1 А). Математически зависимость можно описать уравнением линейной регрессии $y=0,99 + 0,07x$ ($r=0,83$; $p=0,003$), где y - число фокусов/ядро, а x - номер пассажа. Подобная картина наблюдается и для колокализованных фокусов γ H2AX и pATM (рис. 1 А). Зависимость изменения числа колокализованных фокусов описывается линейным уравнением $y=0,72+ 0,03x$ ($r=0,73$; $p=0,017$), 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. 1 Б, число γ H2AX, pATM и колокализованных фокусов в клетках на поздних пассажах статистически значимо выше по сравнению с клетками на ранних пассажах. Однако если число фокусов γ H2AX увеличивается в ~ 3 раза, то число pATM и колокализованных фокусов увеличивается всего \sim в 2 раза, соответственно. Сравнение доли фокусов γ H2AX, колокализованных с pATM, показывает, что если на ранних пассажах с pATM было колокализовано 43 ± 2 % фокусов γ H2AX, то на поздних пассажах колокализация составляет всего 27 ± 1 % (рис. 1 В). Таким образом, можно сделать предварительное заключение о том, что резкое увеличение числа фокусов γ H2AX на поздних пассажах является ATM-независимым.

На рис. 2 представлены результаты подсчёта числа фокусов γ H2AX в пролиферирующих (Ki67+) и покоящихся (Ki67-) клетках.

Видно, что в пролиферирующих клетках число фокусов γ H2AX на 3-16 пассажах меняется незначительно, а на 18-22 пассажах происходит их резкое увеличение (рис. 2 А). В покоящихся клетках наблюдается несколько иная картина (рис. 2 А). Также как в случае с фокусами pATM, изменение их числа от количества клеточных пассажей можно описать уравнением линейной регрессии $y=0,02+0,12x$ ($r=0,96$; $p=0,00001$), где y - число фокусов/ядро, а x - номер пассажа. Более того, между числом фокусов γ H2AX и pATM на разных пассажах отмечается статически значимая корреляционная зависимость ($r=0,87$; $p=0,001$).

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, \sim в 3 раза независимо от пролиферативной активности (рис. 2 Б). Однако абсолютное число фокусов различается: $\sim 6,4$ 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 статически значимое ($p<0,01$) увеличение числа фокусов γ H2AX \sim в 3 раза по сравнению с клетками на ранних (3-8) пассажах. Таким образом, нами было показано, что МСК на ранних пассажах (3-8) после выделения обладают наиболее оптимальными характеристиками, позволяющими использовать их в экспериментальной работе.

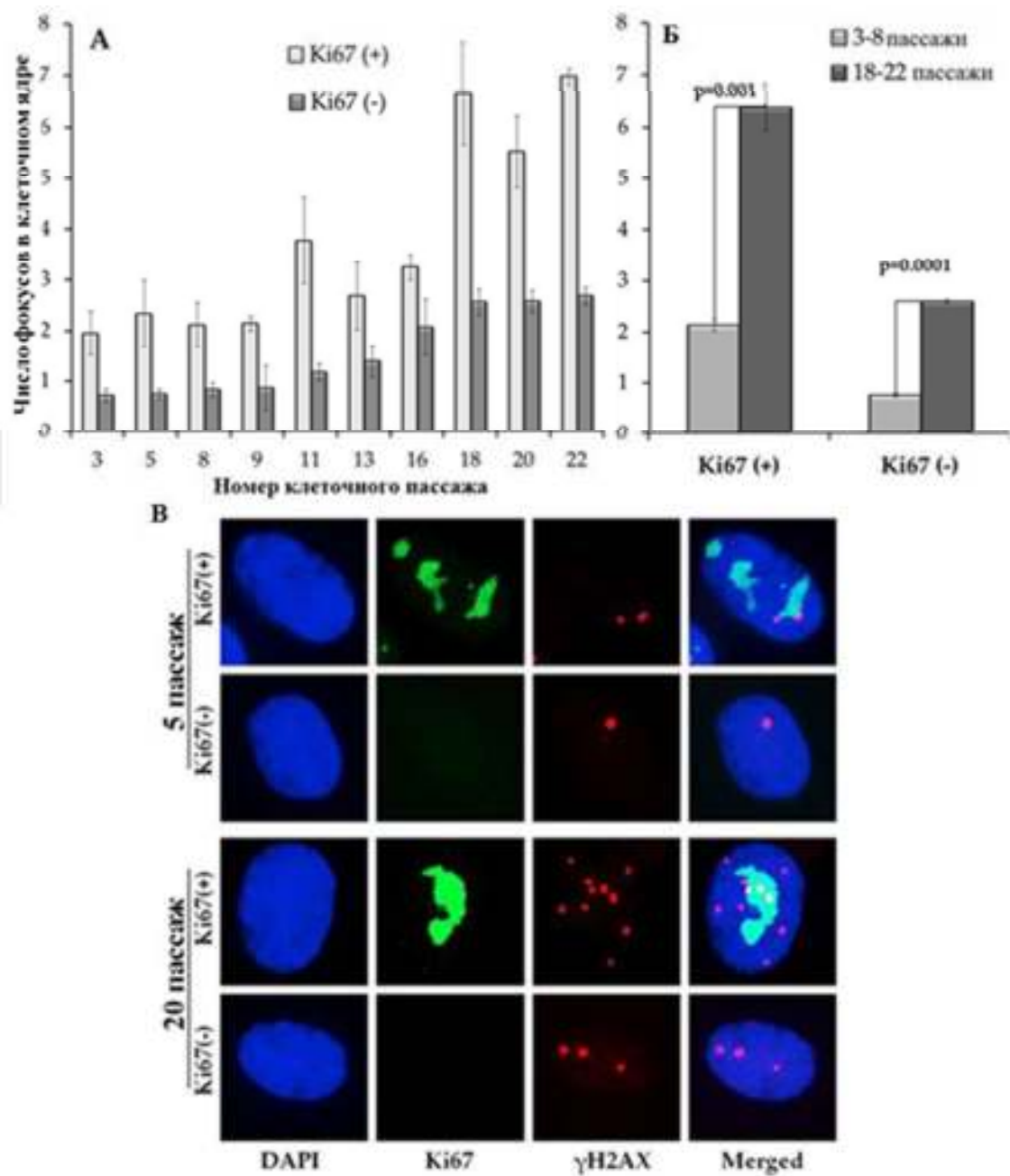


Рисунок 2. Дифференцированный иммуноцитохимический анализ фокусов γ H2AX в Ki67+ и Ki67- клетках. (А) изменения числа фокусов γ H2AX в Ki67+ и Ki67- клетках на 3-22 клеточных пассажах; (Б) сравнительный анализ γ H2AX в Ki67+ и Ki67- клетках на ранних (3-8) и поздних (18-22) клеточных пассажах; (В) микрофотографии флуоресцентно окрашенных Ki67+ и Ki67- клеточных ядер на 5 и 20 клеточных пассажах. Ядра окрашены DAPI в синий цвет. Ki67 - зеленый, γ H2AX - красный.

3.2 Ранние радиационные эффекты

3.2.1 Оценка изменений числа и колокализации фокусов γ H2AX 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 γ H2AX, фокусов фосфорилированной (активной) АТМ (pATM) и их колокализации в ранние временные сроки (5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин) после облучения МСК десны 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 γ H2AX от дозы излучения.

Результаты анализа дозовых зависимостей представлены графически на рис. 3. Через 5 мин после облучения зависимость числа фокусов γ H2AX от дозы можно с высокой значимостью аппроксимации ($r=0,974$; $p=0,001$; $R^2=0,949$) описать линейным уравнением $y=(0,588\pm 0,279) + (0,019\pm 0,002)x$, где y - среднее число фокусов в клеточном ядре, x - доза излучения в мГр (рис. 3).

Таким образом, для МСК средний выход фокусов γ H2AX на единицу поглощенной дозы через 5 мин после облучения равен $\sim 19\pm 2$ 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 $y=(0,813\pm 0,110)+(0,006\pm 0,001)x$, 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 АТМ через 5 мин после облучения и об АТМ-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 γ H2AX и pATM. Расчетное число фокусов γ H2AX 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 γ H2AX и pATM наблюдается через 30 мин после облучения. В эту временную точку зависимость числа фокусов γ H2AX от дозы описывается линейным уравнением $y=(1,600\pm 0,421)+(0,033\pm 0,003)x$ ($r=0,980$; $p=0,0006$; $R^2=0,960$), а дозовая зависимость pATM - $y=(0,931\pm 0,334) + (0,032\pm 0,003)x$ ($r = 0,987$; $p = 0,0002$; $R^2 = 0,974$), где y - среднее число фокусов в клеточном ядре, x - доза излучения в мГр. В пересчете на 1 Гр, для γ H2AX получается 33 ± 3 , а для pATM 32 ± 3 фокуса/клетку/Гр. То есть, количественный выход фокусов γ H2AX 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 γ H2AX 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 γ H2AX, так и pATM, что обычно указывает на процесс восстановления поврежденных цепей ДНК.

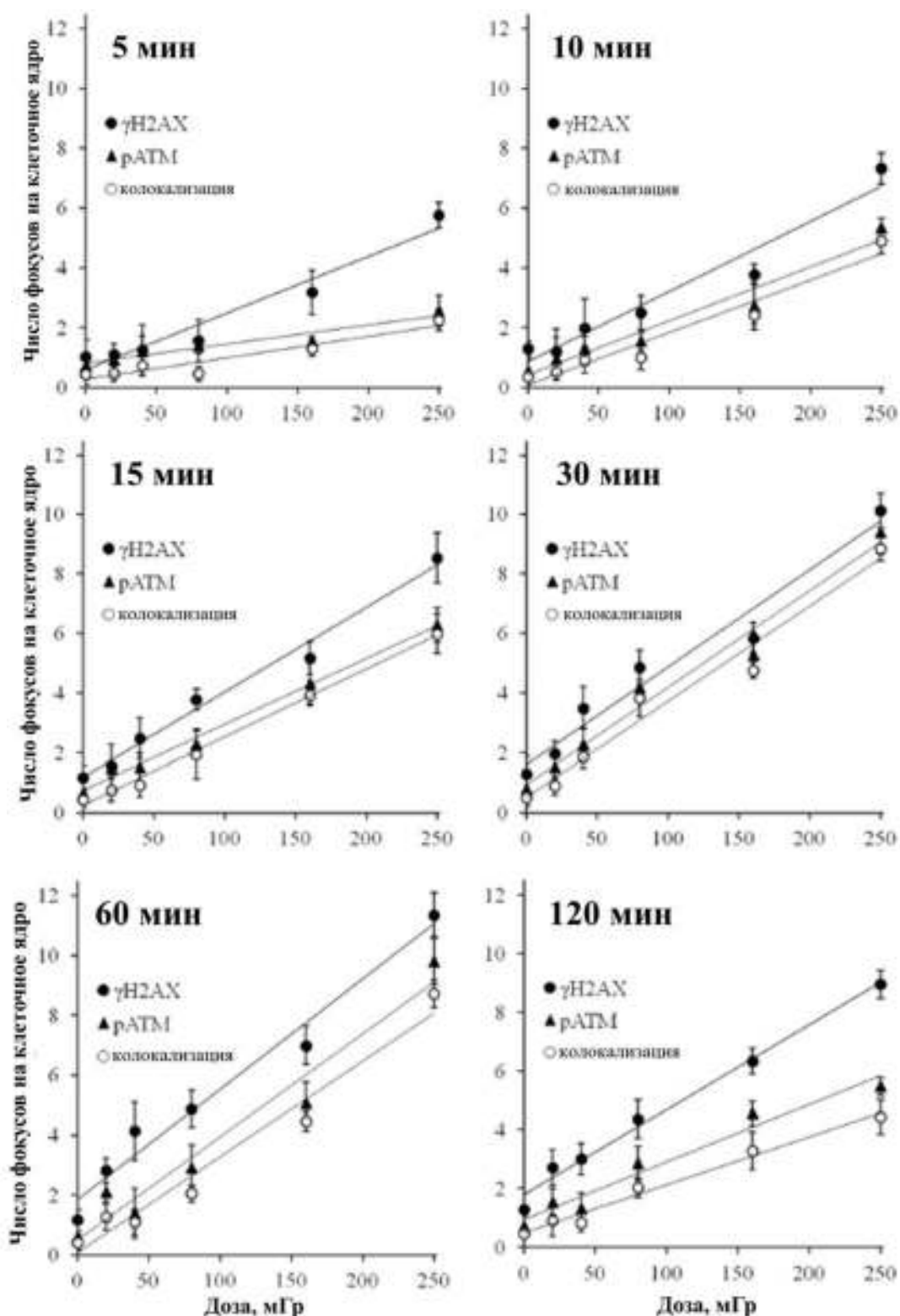


Рисунок 3. Зависимость числа фокусов γ H2AX, pATM и их колокализации в ядрах МСК человека от дозы рентгеновского излучения в различное время после воздействия.

Результаты исследования кинетики изменения числа фокусов γ H2AX, pATM и их колокализации в культивируемых МСК человека после облучения в дозах 20, 40, 80, 160 и 250 мГр представлены на рис. 4.

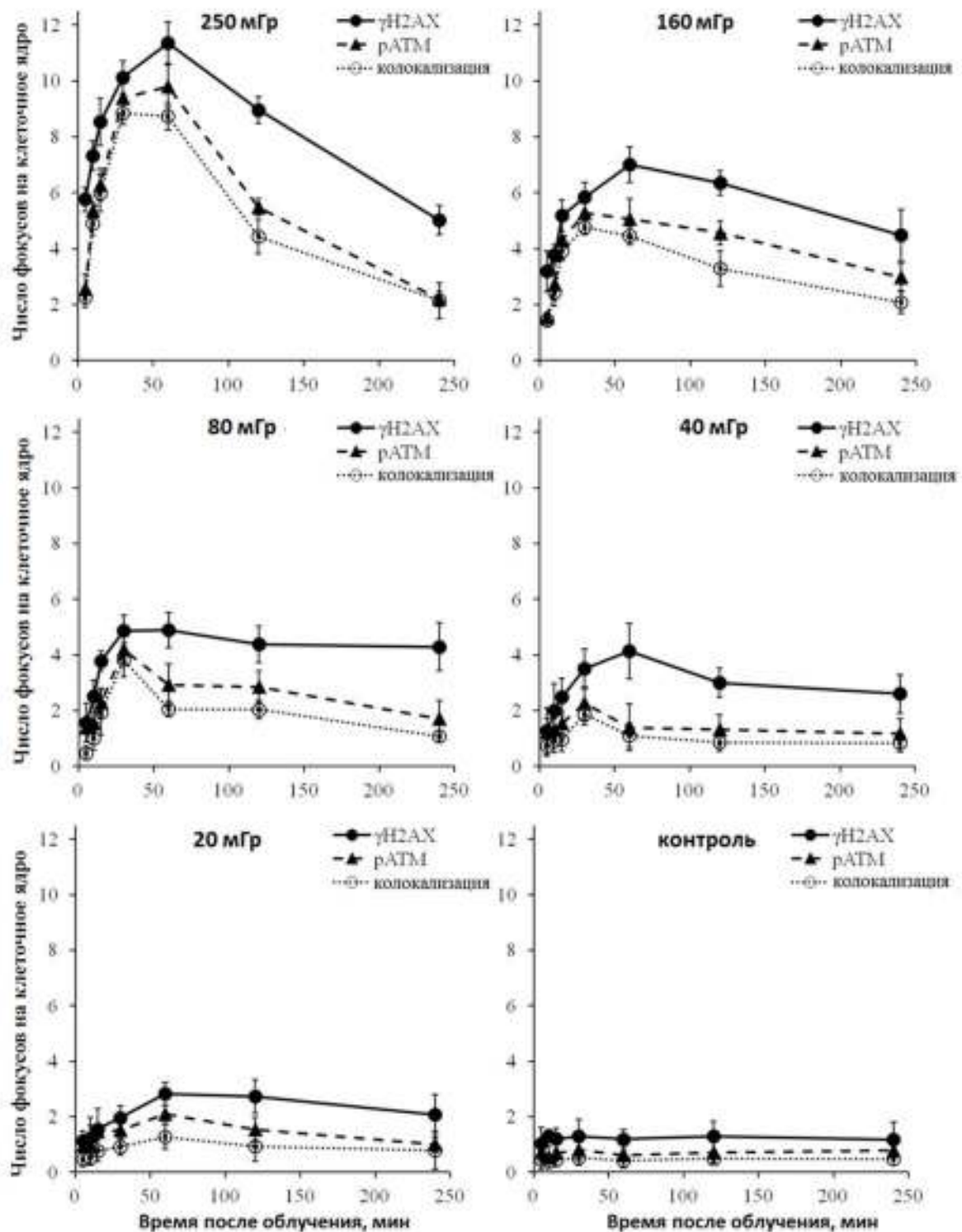


Рисунок 4. Кинетики изменения числа фокусов γ H2AX, pATM и их колокализации в ядрах МСК человека после воздействия рентгеновского излучения в дозах 20-250 мГр.

Было показано, что после облучения в дозе 250 мГр наблюдается увеличение числа фокусов γ H2AX с максимумом на 1 ч, после чего в течение последующих 3 ч происходит уменьшение их числа до $\sim 40\%$ от наблюдаемого в точке максимума ($p = 0,0004$). Уменьшение дозы до 160 мГр отражается на кинетике процесса: снижение числа фокусов γ H2AX происходит более медленно и через 4 ч после облучения остается уже $\sim 60\%$ фокусов ($p = 0,0487$). Дальнейшее снижение дозы рентгеновского излучения до 80, 40 и 20 мГр (диапазон малых доз) приводит к тому, что число фокусов γ H2AX статически значимо не уменьшается через 4 ч после облучения ($p=0,334$, $p=0,232$ и $p=0,607$ соответственно) (рис. 4).

Результаты анализа фокусов рАТМ и их колокализации с фокусами γ H2AX свидетельствуют о том, что в случае облучения в дозе 250 мГр максимум активности АТМ приходится на 30-60 мин после облучения (рис. 4). Как уже отмечалось ранее при анализе дозовых зависимостей, уже через 5 мин после облучения отмечается увеличение числа фокусов γ H2AX, неколокализованных с фокусами рАТМ, для дозы 160 и 250 мГр.

После облучения в дозах 40 и 80 мГр максимум фокусов рАТМ наблюдался через 30 мин, после чего отмечалось снижение числа как самих фокусов рАТМ, так и фокусов рАТМ, колокализованных с γ H2AX, практически до контрольных значений (рис. 4). В клетках, облученных в дозе 20 мГр, отмечались похожие процессы, но с максимумом фокусов рАТМ на 60 мин. Это свидетельствует о том, что механизмы поддержания высокого числа фокусов γ H2AX через 2-4 ч после облучения в малых дозах являются АТМ независимыми.

3.2.2 Сравнительные исследования изменений числа и колокализации фокусов γ H2AX и рАТМ в ядрах мезенхимальных стволовых клеток, облученных в дозах 80 и 1000 мГр

На следующем этапе работы нами было решено провести сравнительные исследования кинетики образования и деградации фокусов γ H2AX и рАТМ 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, поскольку наблюдаемые радиобиологические эффекты после облучения в этой дозе уже ярко выражены.

Для исследований пострадиационных изменений числа фокусов γ H2AX 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 γ H2AX в МСК человека. При этом известно, что примерно через 4-6 ч после облучения заканчивается быстрая фаза репарации ДР, за время которой репарируется $\sim 80\%$ ДР ДНК, а к 24 ч медленная фаза репарации. Результаты исследований показали, что кинетика

пострадиационных изменений числа фокусов γ H2AX после облучения в дозах 80 и 1000 мГр существенно отличается (рис. 5).

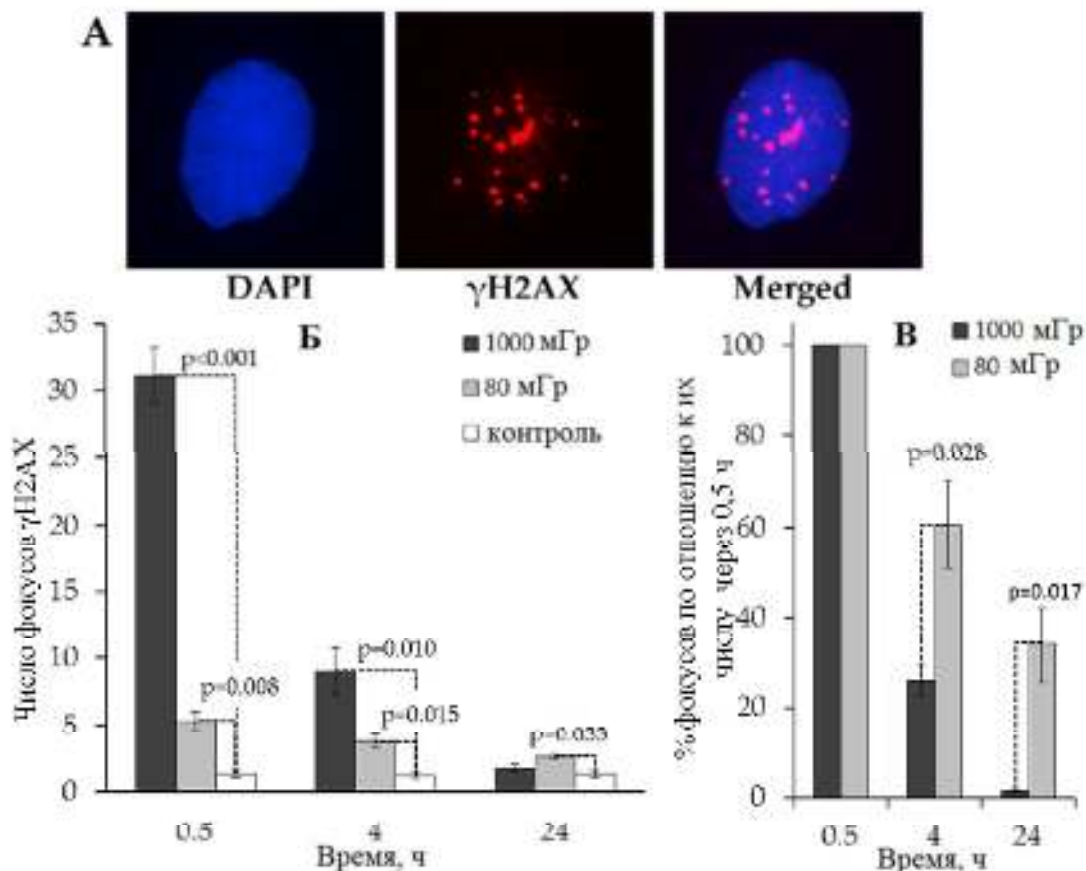


Рисунок 5. Иммуноцитохимический анализ фокусов γ H2AX в МСК, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (А) Микрофотографии МСК, окрашенных DAPI и флуоресцентно-мечеными антителами к γ H2AX. (Б) Число фокусов в клетках, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (В) Доля фокусов в процентах от числа, образующегося через 0,5 ч после облучения.

В то время как через 4 ч после облучения в дозе 1000 мГр регистрируется только $25,8 \pm 3,1$ % фокусов от числа, наблюдаемого через 0,5 ч (рис. 5 В), то через 4 ч после облучения в дозе 80 мГр – $60,5 \pm 9,8$ % (рис. 5 В). Через 24 ч после облучения различия становятся еще более выраженными: $1,3 \pm 0,4$ % в клетках, облученных в дозе 1000 мГр и $33,6 \pm 8,2$ % после облучения в дозе 80 мГр (рис. 5 В). Число фокусов γ H2AX через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр было также статистически значимо ($p=0,033$) выше контрольных значений (рис. 5 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 γ H2AX.

Результаты исследований пострадиационных изменений числа фокусов γ H2AX, колокализованных с фокусами фосфорилированной киназы АТМ, показали, что

через 24 ч после облучения в дозе 80 мГр доля фокусов γ H2AX, колокализованных с pATM, не отличалась от контрольного уровня (рис. 6). Это может свидетельствовать о том, что наблюдаемые после облучения в дозе 80 мГр остаточные фокусы γ H2AX 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. 6 В). При этом не отмечалось статистически значимых различий между клетками, облученными в малой и средней дозах (рис. 6 В). Уже через 4 ч после облучения в малой дозе абсолютное число колокализованных фокусов статистически достоверно не отличалось от контрольных значений (рис. 6 Б).

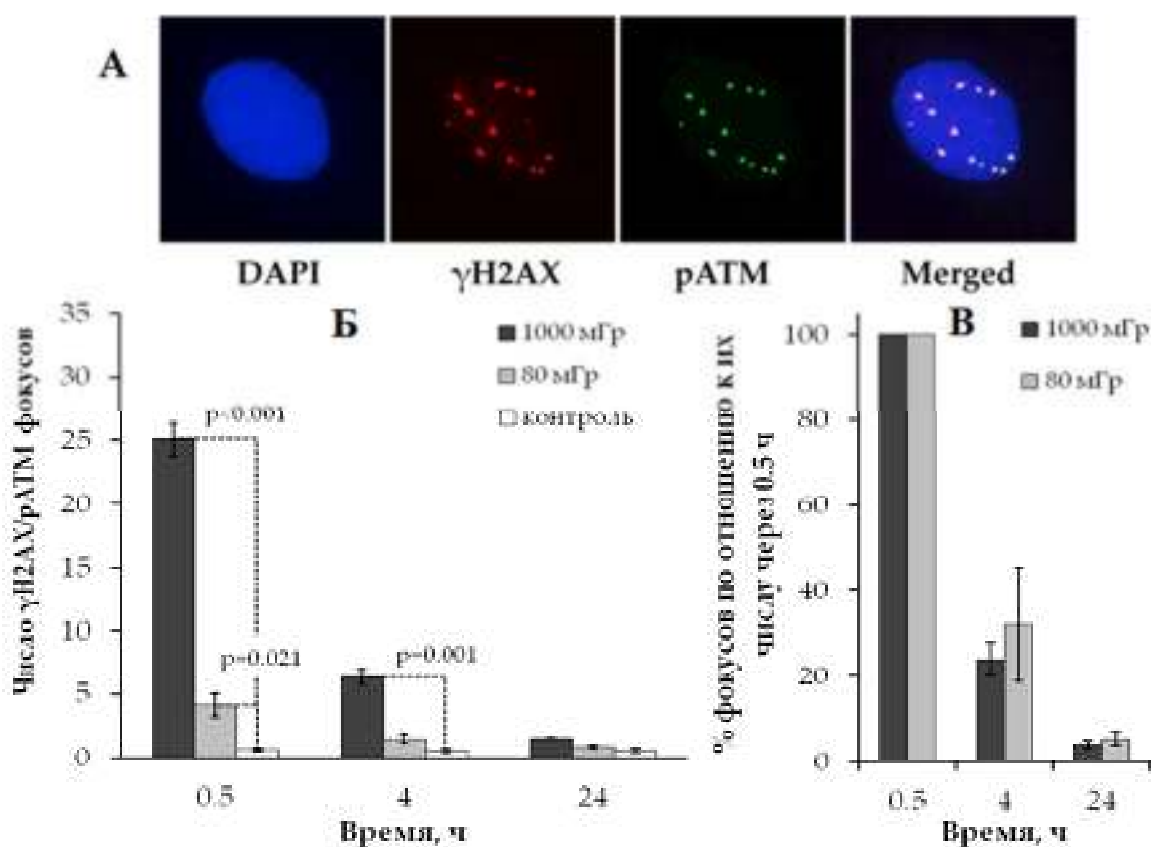


Рисунок 6. Иммуноцитохимический анализ колокализации фокусов γ H2AX/pATM в МСК, облученных в дозах 80 мГр и 1000 мГр. (А) Микрофотографии МСК, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к pATM (зеленые фокусы) и γ H2AX (красные фокусы). Ядра окрашены DAPI (синий). (Б) Сравнительные изменения колокализации фокусов γ H2AX/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 γ H2AX в МСК, облученных в малой дозе рентгеновского излучения.

3.2.3 Анализ изменения числа фокусов γ H2AX в пролиферирующих и покоящихся клетках

Известно, что процессы индукции и репарации ДР ДНК в пролиферирующих и покоящихся клетках существенно различаются. 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 γ H2AX 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 пострadiационных изменений числа фокусов γ H2AX 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. 7 Б видно, что в пролиферирующих клетках фоновое число фокусов γ H2AX ~ в 4 раза ($p < 0,001$) выше, чем в покоящихся ($2,74 \pm 0,11$ и $0,68 \pm 0,11$, соответственно).

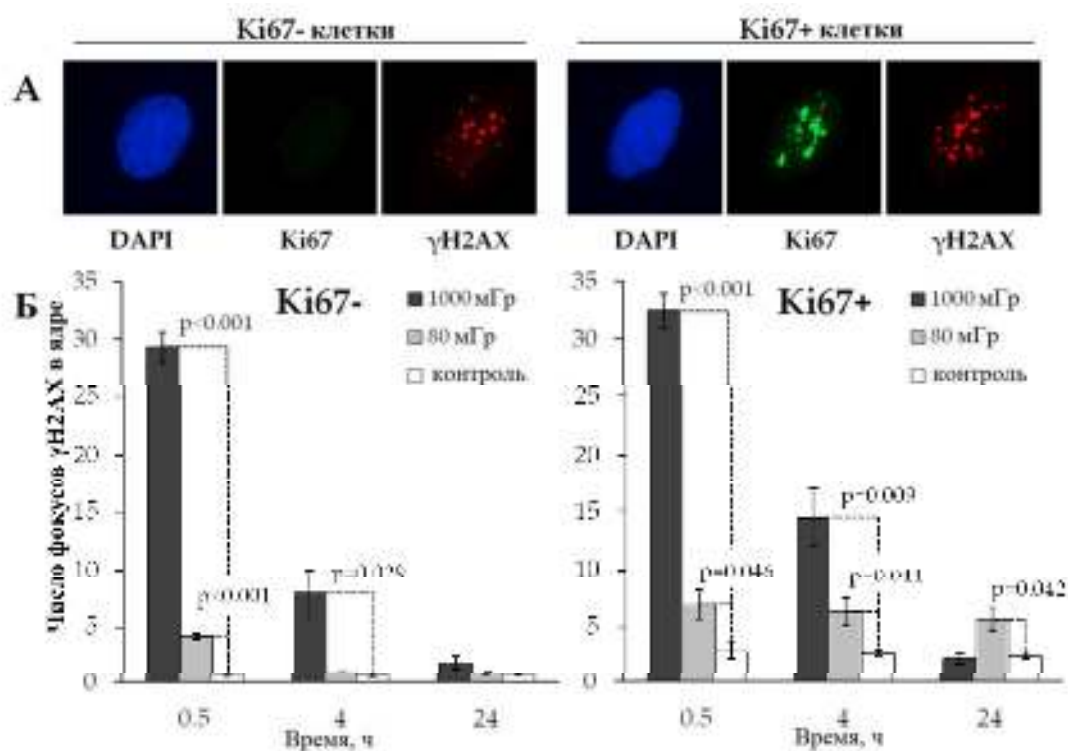


Рисунок 7. Иммуноцитохимический анализ фокусов γ H2AX в покоящихся (Ki67-) и пролиферирующих (Ki67+) клетках. (А) Микрофотографии иммунофлуоресцентно окрашенных облученных МСК. Белок Ki67 – зеленый, фокусы γ H2AX – красные. Ядра окрашены DAPI в синий цвет. (Б) Сравнительный анализ изменений числа фокусов в покоящихся и пролиферирующих клетках, облученных рентгеновским излучением в дозах 80 мГр и 1000 мГр.

После облучения как в средней, так и в малой дозе в покоящихся клетках отмечалась сходная кинетика изменений числа фокусов γ H2AX (рис. 7 Б, левая панель). Так через 4 часа после облучения в средней дозе (1000 мГр) оставалось $25,2 \pm 6,5$ %, а через 24 ч $4,6 \pm 2,1$ % фокусов от числа, зарегистрированного через 0,5 ч. Уже через 4 часа после облучения в малой дозе (80 мГр) абсолютное число фокусов γ H2AX статистически значимо не отличалось от контрольных значений (рис. 7 Б, левая панель).

В пролиферирующих клетках наблюдается иная картина. После облучения в малой дозе число фокусов γ H2AX практически не меняется и даже через 24 ч остается статистически значимо ($p=0,042$) выше контрольных значений (рис. 7 Б, правая панель). Таким образом, результаты исследований позволяют прийти к заключению о том, что длительное поддержание повышенного числа фокусов γ H2AX после облучения в малой дозе связано с пролиферативной активностью клеток.

3.3 Отдаленные эффекты облучения

3.3.1 Количественный анализ фокусов γ H2AX в потомстве облученных клеток

В предыдущих частях работы было показано, что присутствие повышенного числа фокусов γ H2AX 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 γ H2AX на 3, 5, 8 и 11 клеточных пассажах после облучения МСК костного мозга человека.

При анализе результатов исследований, представленных на рис. 8, 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 γ H2AX \sim в 1,7 раза ($p=0,022$) выше, по сравнению с 3-м (6-м с начала культивирования) пассажем (рис. 8). Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными для длительно-культивируемых МСК десны. По всей видимости, увеличение числа фокусов γ H2AX на поздних пассажах первичных нормальных (неиммортизированных и неопухолевых) клеточных культур тесно ассоциировано с процессами клеточного старения.

Из рис. 8 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 γ H2AX 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 γ H2AX

(рис. 8). При этом число фокусов γ H2AX в потомках клеток, облученных в дозе 80 мГр, статистически значимо не отличается от контрольных значений на соответствующих пассажах (рис. 8).

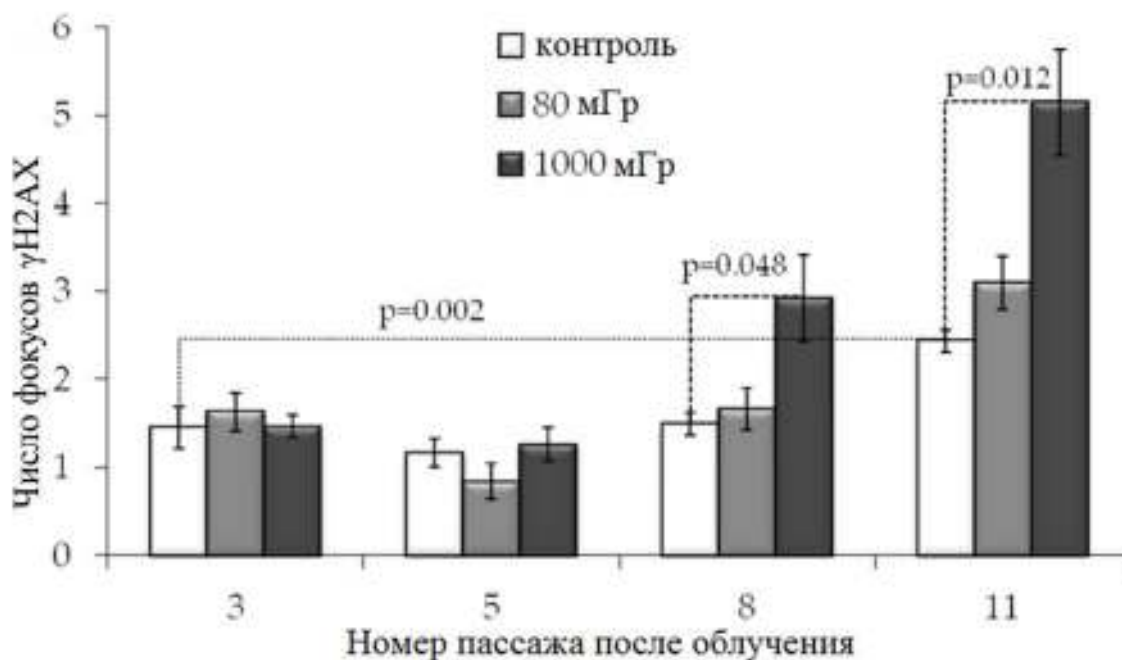


Рисунок 8. Изменение числа фокусов γ H2AX в зависимости от клеточного пассажа в контрольных и облученных клетках.

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 γ H2AX в потомках облученных клеток.

3.3.2 Оценка пролиферативной активности в потомстве облученных клеток

Одним из наиболее важных характеристик клеточной популяции является пролиферативная активность. При старении клеток теряется их способность к делению. 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. 9). 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. 9).

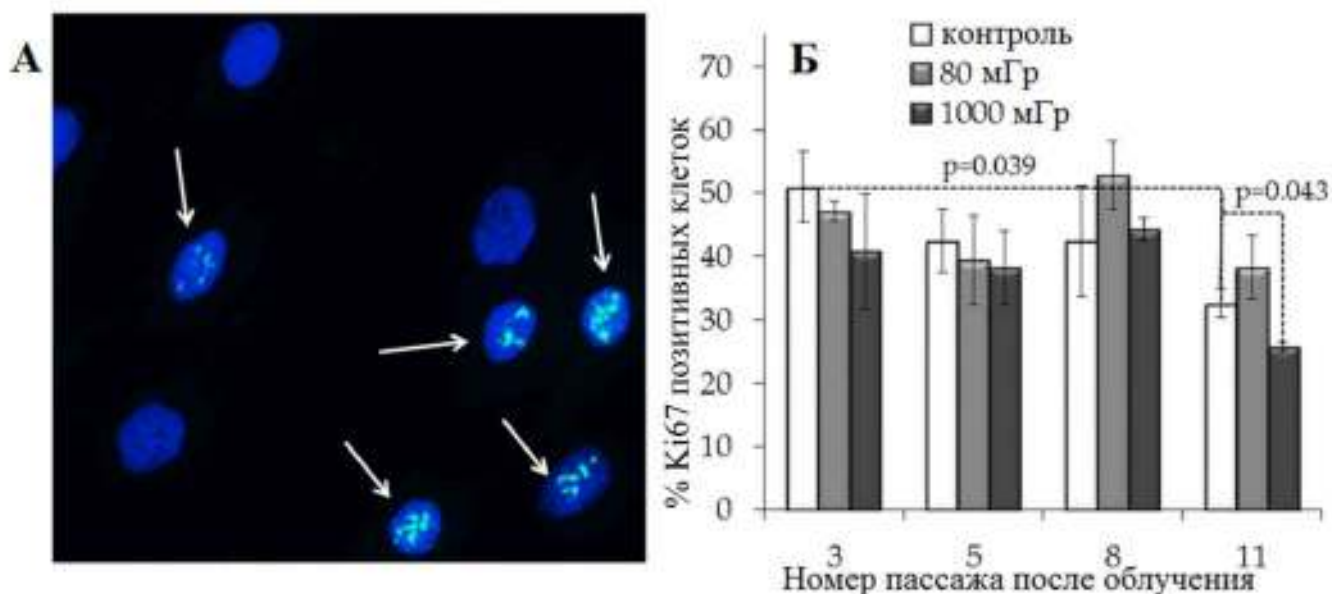


Рисунок 9. Иммуноцитохимический анализ пролиферативной активности клеток (Ki67+). (А) Микрофотография МСК, окрашенных флуоресцентно-мечеными антителами к белку Ki67 (Ki67+ клетки указаны стрелками). (Б) Изменение клеточной пролиферации в зависимости от пассажа в контрольных и облученных МСК.

3.3.3 Оценка клеточного старения в потомстве облученных клеток

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. 10, 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. 10 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. 10 Б).

В целом, полученные результаты позволяют сделать важное заключение о том, что облучение в малой дозе не индуцирует процесс ускоренного старения в потомках облученных клеток.

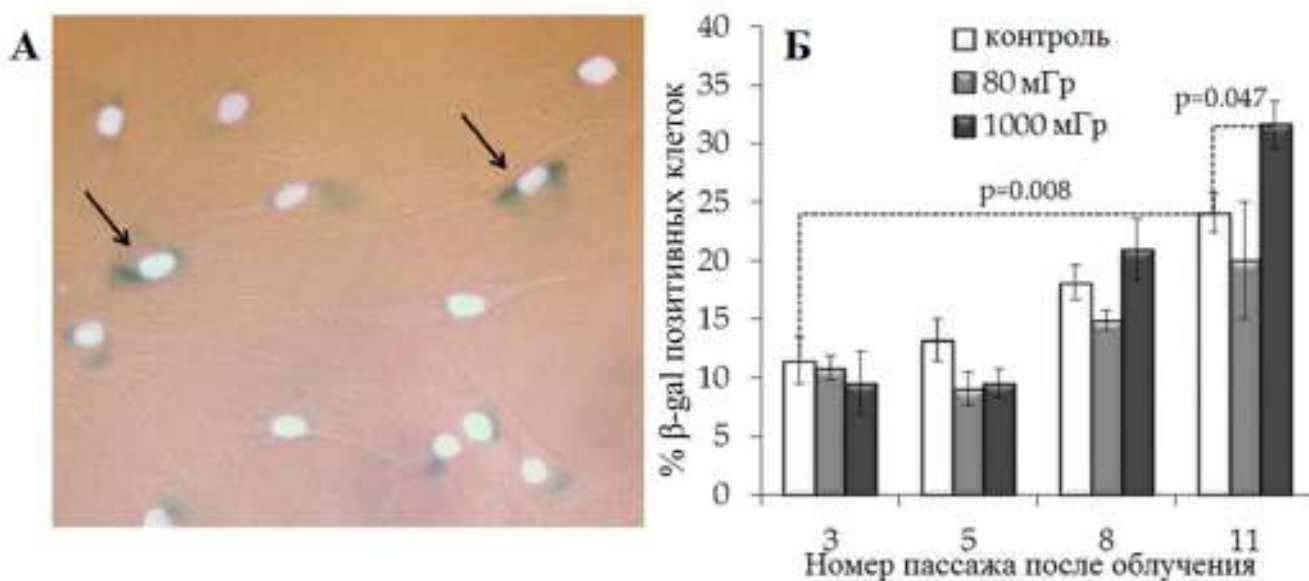


Рисунок 10. Анализ SA-β-gal позитивных клеток на различных пассажах в контрольных и облученных МСК. (А) Изображения SA-β-gal позитивных клеток (указаны стрелками – цитоплазма окрашена в темно-зеленый цвет). Ядра окрашены Ноеchst 33342 (голубые). (Б) Изменение процента SA-βgal позитивных клеток в зависимости от клеточного пассажа в контрольных и облученных клетках.

В целом результаты исследований, представленные в главе 3, свидетельствуют о том, что индуцированные рентгеновским излучением в дозе 80 мГр в культивируемых МСК человека АТМ-независимые длительно существующие фокусы γН2АХ связаны с клеточной пролиферацией и не приводят к отдаленным последствиям облучения, ассоциированным со старением (накопление фокусов γН2АХ, увеличение доли SA-βgal позитивных клеток, пролиферативная активность).

Точная интерпретация результатов, полученных при измерении количества фокусов γН2АХ, может потребовать дополнительных анализов, таких как количественная оценка фокусов рАТМ, клеточная пролиферация и старение, в течение длительных периодов времени. Необходимо подчеркнуть, что фокусы γН2АХ 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 АТМ. Фосфорилирование гистона H2AX в МСК в первые 10-60 мин после облучения является АТМ-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 АТМ-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Pustovalova, Margarita Residual γ H2AX 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 / Margarita Pustovalova, Tatiana A. Astrelina, Anna Grekhova, Natalia Vorobyeva, Anastasia Tsvetkova, Taisia Blokhina, Victoria Nikitina, Yulia Suchkova, Daria Usupzhanova, Vitalyi Brunchukov, Irina Kobzeva, Tatiana Karaseva, Ivan V. Ozerov, Aleksandr Samoylov, Andrey Bushmanov, Sergey Leonov, Evgeny Izumchenko, Alex Zhavoronkov, Dmitry Klokov, Andreyan N. Osipov // **Aging**. - 2017. - V.9. - P.2397-2410.
2. Pustovalova, Margarita Accumulation of spontaneous γ H2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells / Margarita Pustovalova, Anna Grekhova, Tatiana Astrelina, Viktoria Nikitina, Ekaterina Dobrovolskaya, Yulia Suchkova, Irina Kobzeva, Darya Usupzhanova, Natalia Vorobyeva, Aleksandr Samoylov, Andrey Bushmanov, Ivan V. Ozerov, Alex Zhavoronkov, Sergey Leonov, Dmitry Klokov, Andreyan N. Osipov // **Aging**. - 2016. - V.8. - P.3498-3506.
3. Osipov, Andreyan N. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of γ H2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells / Andreyan N. Osipov, Margarita Pustovalova, Anna Grekhova, Petr Eremin, Natalia Vorobyeva, Andrey Pulin, Alex Zhavoronkov, Sergey Roumiantsev, Dmitry Y. Klokov, Ilya Eremin // **Oncotarget**. - 2015. - V. 6. - P. 275-287.
4. Пустовалова, М.В. Мезенхимальные стволовые клетки: эффекты воздействия ионизирующего излучения в малых дозах. / М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, А.Н. Осипов // **Радиационная биология. Радиоэкология**. - 2018. - Т. 58., № 4 (принята в печать).

Тезисы конференций:

1. Pustovalova, Margarita ATM-dependent histone H2AX phosphorylation in human gingival mesenchymal stem cells exposed to X-ray radiation at low and intermediate doses / Margarita Pustovalova, Anna Grekhova, Andreyan Osipov // EMBO/FEBS Lecture Course Chromatin and the environment. 8-14 August 2016/ Spetses, Greece. 2016. - P.90.
2. Pustovalova, Margarita ATM-dependent histone H2AX phosphorylation in human gingival mesenchymal stem cells exposed to X-ray radiation at low and intermediate doses / Margarita Pustovalova, Anna Grekhova, Natalia Vorobyeva, Andreyan Osipov // Abstracts 62nd Annual International Meeting Radiation Research Society (October 16-19. 2016. Hawaii). P. 409-410. CRHPS-27.
3. Пустовалова, М.В. Закономерности изменения количества фокусов pATM и γ H2AX в мезенхимальных стволовых клетках человека, облученных ионизирующим излучением в малых и умеренно-низких дозах / М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // Сборник тезисов

- Международного научно-практического форума «Ядерные технологии на страже здоровья» (1-3 ноября 2016). Москва. 2016. - С.94-95.
4. Пустовалова, М.В. Закономерности АТМ-зависимого фосфорилирования гистона H2AX в мезенхимальных стволовых клетках человека, облученных ионизирующим излучением в малых и умеренно-низких дозах / М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, А.Н. Осипов // Сборник трудов XXI ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. Москва. 2016. С.56-59.
 5. Pustovalova, Margarita Characteristics of spontaneous γ H2AX foci accumulation in long - term cultured human mesenchymal stem cells / Margarita Pustovalova, Anna Grekhova, Andreyan Osipov // 42nd Congress of The Federation of the European Biochemical Societies (FEBS) on September 10–14th. 2017. Jerusalem. Israel. FEBS J, 284:P.1.2-007
 6. Пустовалова, М.В. Особенности формирования ранних и отдаленных эффектов в мезенхимальных стволовых клетках человека после воздействия рентгеновского излучения в малой и средней дозах / М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, А.Н. Осипов // Сборник трудов XXIII ежегодной научной конференции Института химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, секция Динамика химических и биологических процессов. Москва. 2018. С.- 56-59.
 7. Пустовалова, М.В. Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского излучения в малой и средней дозах в мезенхимальных стволовых клетках костного мозга человека / М.В. Пустовалова, А.К. Грехова, А.Н. Осипов // Сборник трудов школы-конференции молодых ученых с международным участием «Ильинские чтения». Москва. 2018. - С.118-119.