

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

На правах рукописи

АБДУЛЛАЕВ СЕРАЖУТДИН АБДУЛЛАЕВИЧ

**ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И
СТАБИЛИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА**

Специальность 1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научные консультанты:

доктор биологических наук, профессор РАН

Осипов Андреян Николаевич

доктор биологических наук, профессор

Газиев Ажуб Ибрагимович

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ В РАБОТЕ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Роль мтДНК в функционировании и стабильности клеток млекопитающих при действии ионизирующей радиации	17
1.1.1. Структурно-функциональная характеристика мтДНК	19
1.1.2. Повреждение мтДНК как результат воздействия эндогенных факторов и радиации	26
1.1.3. Репарация и мутагенез мтДНК	31
1.1.4. Генерация АФК в митохондриях клеток после воздействия радиации	37
1.1.5. Антиоксидантная защита в митохондриях облученных клеток.....	42
1.1.6. Биогенез, динамика и митофагия митохондрий	46
1.2. Внеклеточная ДНК как потенциальный биомаркер оценки лучевой реакции организма	57
1.3. Влияние радиопротекторов на функционирование митохондрий и целостность мтДНК в облученных клетках	62
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	70
2.1. Лабораторные животные.....	70
2.2. Облучение.....	70
2.3. Приготовление и условия введения препаратов животным.....	71
2.4. Пострадиационная выживаемость животных.....	71
2.5. Микроядерный тест	72
2.6. Выделение ДНК	72
2.7. Определение концентрации ДНК.....	73
2.8. Выделение РНК.....	73
2.9. Определение концентрации РНК.....	75

2.10. Обратная транскрипция для генов мРНК.....	75
2.11. Определение экспрессии генов мРНК методом ПЦР в реальном времени.....	75
2.12. Определение количества копий мтДНК относительно яДНК методом ПЦР в реальном времени	78
2.13. Определение повреждения и восстановления яДНК и мтДНК методом количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК	78
2.14. Определение мутантных копий мтДНК	80
2.15. Биохимические анализы уровней пероксида водорода, АТФ, малонового диальдегида и восстановленного глутатиона	83
2.16. Статистическая обработка экспериментальных данных	84
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	85
3.1. Исследование репарации яДНК, восстановления уровня копий мтДНК, а также экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, регуляции биогенеза и динамики митохондрий в разных структурах головного мозга крыс (гиппокамп, кора, мозжечок) после радиационного воздействия	85
3.2. Определение уровней мутантных копий и общего количества копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки мышей в зависимости от дозы облучения и пострadiационного периода	100
3.3. Изменения количества внеклеточных мутантных копий и общего содержания копий мтДНК в плазме крови мышей в пострadiационный период	104
3.4. Исследование содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения и цитостатического препарата блеомицина	108
3.5. Исследование радиопротекторных и радиомитигаторных эффектов мелатонина в тканях коры головного мозга и селезенки мышей при облучении	119
3.6. Исследование влияния метформина на пострadiационную выживаемость мышей, образование микроядер в клетках костного мозга и экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс.....	137

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	158
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Благодарность	211
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Акты внедрения	212

СПИСОК ПРИНЯТЫХ В РАБОТЕ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

вк-ДНК – внеклеточная ДНК

вк-яДНК – внеклеточная ядерная ДНК

вк-мтДНК – внеклеточная митохондриальная ДНК

ГЛТ – восстановленный глутатион

ИИ – ионизирующее излучение

МДА – малоновый диальдегид

МЕЛ – мелатонин

МФ – метформин

мтДНК – митохондриальная ДНК

dNTP – дезоксинуклеотид трифосфаты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЦР-ПФ – полимеразная цепная реакция на протяженных фрагментах

H₂O₂ – пероксид водорода

ТФФ – трифенилфосфоний

ЦПЭ – цепь переноса электронов

ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов

ЭРО – эксцизионная репарация оснований

яДНК – ядерная ДНК

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности проблемы. Исследование структурно-функциональных нарушений генома в клетках человека и животных, подвергнутых воздействию ионизирующих излучений (ИИ), в настоящее время остается актуальным. Основополагающие исследования по данной проблеме проводятся, ориентируясь на важнейшую мишень радиационного поражения – ядерную ДНК (яДНК). Однако известно, что в клетках млекопитающих кроме яДНК содержится и множество копий митохондриальной ДНК (мтДНК). В настоящее время ряд авторов считают, что мтДНК является более уязвимой мишенью клетки, по сравнению с яДНК, для эндогенных и экзогенных повреждающих агентов [1, 2].

МтДНК представляет собой кольцевую двуцепочечную молекулу и состоящую из 37-ми генов, продукты 13-ти из которых участвуют в системе дыхательной цепи [3-5]. Для нее характерна повышенная мутабельность, благодаря повреждениям, индуцируемым активными формами кислорода (АФК), генерируемыми в самих митохондриях, и ошибками репликативного синтеза [6-8]. В тканях (в том числе в постмитотических тканях мозга, сердца, скелетных мышц) мтДНК может реплицироваться независимо от клеточного цикла в течение всей жизни организма [9, 10]. Результаты многих исследований показывают, что при воздействии на клетки ИИ или химических мутагенов в мтДНК возникает в 3-50 раз больше повреждений, чем в соразмерном фрагменте яДНК [11-12]. Процессы репарации ДНК в митохондриях клеток функционируют менее эффективно, чем в яДНК [13-15]. Если репликация поврежденной яДНК блокируется индуцибельной системой контроля клеточного цикла до завершения ее репарации, то эта система не блокирует репликацию поврежденной мтДНК в митохондриях [16-18]. Возможно, именно по этим причинам в мтДНК наблюдается накопление мутаций с более высокой частотой, чем в яДНК [19-20].

Вместе с тем, хотя в радиобиологических исследованиях много внимания уделяется радиационно-индуцированному нарушению энергетического метаболизма, сведения по радиационному мутагенезу мтДНК в клетках человека или животных, подвергшихся воздействию ИИ, в литературе ограничены и противоречивы. Так, существуют исследования, где показаны изменения количественных и качественных характеристик фрагментов мтДНК в клетках грызунов, после их облучения [21-24]. Фрагменты мутированной мтДНК наблюдали в крови лиц, проживающих в районах с повышенным радиационным фоном [25]. У пациентов после лучевой терапии выявляется повышенный уровень делеций мтДНК [26]. Вместе с тем у полевок, обитающих в зоне Чернобыльской АЭС мутации мтДНК не были обнаружены [27]. Также не было отмечено повышения частоты мутаций мтДНК у лиц, работающих на ядерном производстве [28] и Семипалатинском полигоне [29].

Стабильность и сохранение митохондриального генома, изменение количества копий мтДНК (дозы генов мтДНК) в клетках играют важную роль в адаптации человека к различным условиям внешней среды. С нарушениями мтДНК ассоциируются широкий спектр заболеваний, ослабление функций тканей, нарушения иммунной системы, развитие опухолевых патологий, старения [30-32].

Поэтому исследование возникновения, аккумуляции мутантных копий мтДНК и изменения количественного содержания копий мтДНК в клетках тканей организма млекопитающих, подвергнутых воздействию ИИ, представляется актуальным и востребованным.

Целью диссертационной работы является исследование повреждений и восстановления мтДНК, наряду с яДНК, в различающихся по радиочувствительности тканях облученных животных, а также выяснение особенностей циркуляции внеклеточных ДНК (вк-ДНК) в биологических жидкостях в пострadiационный период, с целью использования их в качестве неинвазивных биомаркеров оценки ответа организма на облучение и воздействие других

генотоксических агентов, а также для оценки эффективности противолучевых средств.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Исследовать особенности восстановления мтДНК и репарацию яДНК, а также экспрессию генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, регуляции биогенеза и динамики митохондрий в трех участках головного мозга крыс (гиппокамп, кора больших полушарий, мозжечок) после облучения рентгеновскими лучами в разных дозах.
2. Определить общее количество фрагментов мтДНК, а также долю мутированных копий мтДНК в тканях мозга и селезенки мышей в зависимости от дозы облучения и длительности пострadiaционного периода (1-28 дней).
3. Исследовать изменение общего количества фрагментов вк-мтДНК, а также долю мутированных копий вк-мтДНК в плазме крови мышей в зависимости от дозы облучения и длительности пострadiaционного периода.
4. Определить общее количество фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК, а также долю мутированных копий вк-мтДНК в моче крыс в зависимости от дозы облучения или введения блеомицина.
5. Исследовать влияние мелатонина на митохондриальную дисфункцию и уровень восстановления мтДНК и репарацию яДНК в тканях коры мозга и селезенки облученных мышей.
6. Изучить влияние метформина на экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК, в моче облученных крыс, а также образование микроядер в клетках костного мозга и пострadiaционную выживаемость мышей.

Научная новизна. Впервые показано, что активность репарации яДНК, синтез мтДНК и уровень ее мутантных копий, а также модуляции экспрессии генов поддержки митохондрий, различны в гиппокампе, коре и мозжечке крыс после их

облучения, что связано с различиями в радиочувствительности. В регионе гиппокампа наблюдался самый высокий уровень мтДНК с мутациями.

Впервые установлено, что в клетках тканей (головной мозг, селезенка) мышей, подвергнутых воздействию разных доз рентгеновского излучения, резко возрастает уровень мутантных копий мтДНК с максимумом на 8-й день после облучения с последующим снижением их содержания к 28-му дню пострadiaционного времени. Образование мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр).

Результаты анализов мутантных копий мтДНК головного мозга и селезенки облученных мышей показывают снижение количества мутантных копий мтДНК в пострadiaционный период. В ткани селезенки этот процесс происходит более активно, чем в ткани головного мозга. Вместе с тем, общее количество копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей остается в течение всего времени наблюдения после облучения (8-28 дней) без изменения, хотя и ниже на 25-40% по сравнению с показателями контрольной (необлученной) группы (при дозе облучения 5 Гр).

Впервые установлено, что в кровоток облученных мышей в течение пострadiaционного периода поступает большое количество циркулирующей вк-мтДНК, существенная часть которой представлена мутантными копиями. Уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови мышей зависит от дозы излучения. Динамика изменения общего содержания циркулирующей вк-мтДНК и уровня ее мутантных копий в плазме облученных мышей отличается от таковой в тканях селезенки и мозга этих же животных. Увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей совпадает со снижением их уровня в тканях этих же животных.

Впервые показана возможность преодоления трансрeнального (почечного) барьера и перехода в мочу вк-мтДНК, наряду с вк-ядДНК, у животных после

воздействия рентгеновского излучения, а также после введения блеомицина. Обнаружена дозовая зависимость выявленных эффектов. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК мочи облученных крыс содержит мутантные копии.

В работе показано, что последствия радиационного воздействия можно снизить путем введения экзогенного мелатонина до и после радиационного воздействия. Показано, что, хотя ткани селезенки и коры головного мозга мышей отличаются исходными контрольными значениями анализируемых маркеров, антирадиационный потенциал мелатонина успешно реализуется в обеих тканях. Показано, что мелатонин эффективнее проявляет радиозащитные свойства как радиомитигатор.

Показано, что метформин действует как радиомитигаторный эффектор, способствуя активной экскреции вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой облученных крыс, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после воздействия ионизирующей радиации.

Таким образом, полученные результаты являются уникальными и приносят принципиально новые сведения о роли мтДНК в развитии радиационно-индуцированного ответа организма на облучение, а также о возможности использования такого критерия как уровень мтДНК в биологических жидкостях в качестве потенциального неинвазивного биомаркера оценки радиационного поражения и воздействия других генотоксических агентов на организм.

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых данных по формированию радиационного мутагенеза мтДНК и изменению уровней мутантных копий мтДНК в тканях облученных животных в пострadiационной период, которые существенно дополняют знания о механизмах развития лучевой реакции организма.

Практическая значимость. Полученные результаты и использованные методические подходы внедрены в учебную деятельность ФГБОУ Пушинского

государственного естественно-научного института и Медико-биологического университета инноваций и непрерывного образования ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна», в дальнейшем найдут применение в клинической практике при проведении мониторинга радиотерапии опухолей. Важным результатом, ориентированным на практическое использование, является обнаружение повышенного уровня общего количества фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК, а также увеличения содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме и моче облученных животных. Поскольку мтДНК является более уязвимой мишенью (чем яДНК) для ИИ и других генотоксических агентов, то повышенное содержание вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче животных после радиационного воздействия и влияния других генотоксикантов можно рассматривать как потенциальный чувствительный биомаркер для оценки радиационного поражения и наличия генотоксического груза.

Таким образом, практическая значимость данной диссертационной работы определяется возможностью разработки на основе внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях чувствительной неинвазивной быстрой тест-системы оценки клеточной гибели при действии радиации и других генотоксичных агентов, а также оценки эффективности противолучевых средств. Данная тест-система может быть востребована в учреждениях Федерального медико-биологического агентства и в радиологических и радиобиологических отделах прочих учреждений.

Методология и методы исследования. Полученные в ходе экспериментальных исследований данные были обработаны адекватными методами математической статистики с использованием современных компьютерных программ. При проведении исследований были использованы следующие методы:

- молекулярные методы выделения ДНК и РНК из тканей и биологических жидкостей;

- спектрофотометрические и флуориметрические методы определения концентраций ДНК и РНК;
- микроядерный тест;
- анализ выживаемости животных;
- амплификация методом классической ПЦР;
- метод обратной транскрипции для получения кДНК;
- амплификация методом количественной ПЦР-РВ;
- метод количественной ПЦР на протяженных фрагментах (ПЦР-ПФ) для определения повреждений ДНК;
- метод определения мутантных копий мтДНК с помощью специального набора Surveyor® Mutation Detection Kit;
- биохимические методы определения содержания перекиси водорода, АТФ, малонового диальдегида, глутатиона;
- статистические методы обработки полученных данных.

Положения, выносимые на защиту.

1. Наличие в структурах головного мозга крыс повышенного уровня мутантных копий мтДНК (гетероплазмия) с одновременной активацией ее общего синтеза после радиационного воздействия, приводит к нарушению экспрессии генов, регулирующих синтез АТФ, усилению пролонгированного окислительного стресса в митохондриях и к их дисфункции.
2. Мутагенез мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, как и мутагенез ядерных генов, имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр). Процесс снижения мутантных копий мтДНК быстрее протекает в активно пролиферирующих тканях (селезенка), чем в постмитотических тканях (головной мозг).
3. Резкое увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей связано со снижением их уровня в тканях этих же животных.

Повышенное содержание мутантных копий вк-мтДНК и увеличение общей вк-мтДНК в плазме облученных животных зависит от дозы рентгеновского излучения и длительности пострadiaционного периода.

4. Циркулирующие фрагменты вк-мтДНК и вк-яДНК, поступающие в кровоток облученных животных, могут преодолевать «почечный барьер» и переходить в мочу после действия радиации, а также после введения цитостатических препаратов на примере блеомицина. Выявлена дозовая зависимость этих процессов.

5. Введение экзогенного мелатонина до и после облучения способствует пострadiaционной выживаемости животных, активации репарации ДНК и снижению митохондриальной дисфункции в тканях коры головного мозга и селезенки.

6. Метформин усиливает экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой, способствуя удалению поврежденных клеток из тканей облученных животных, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после действия ионизирующей радиации.

Достоверность результатов работы обеспечивается проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью; корректной статистической обработкой полученных данных и необходимым количеством повторных исследований, а также с применением современных методик, высококачественных расходных материалов и современного оборудования. Положения и выводы, сформулированные в диссертации, прошли апробацию на международных и российских научных конференциях и семинаров. Достоверность также подтверждается публикациями в рецензируемых научных отечественных и международных журналах: «Биофизика», «Биомедицинская Химия», «Радияционная биология. Радиоэкология», «Медицинская радиология и радияционная безопасность», «IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering», «Biology Bulletin», «Biogerontology», «Radiation and Environmental Biophysics», «Journal of Circulating Biomarkers», «Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis», «International Journal of Molecular Sciences», «Molecular Biology Reports», «Antioxidants» и др.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 1.5.1 «Радиобиология», охватывающей п. 5 «Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны», п. 6 «Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток», п. 15 «Радиационная защита. Проблемы радиационной безопасности; радиозащита, радиомитигация и радиосенсибилизация. Биологическое действие радиопротекторов и радиосенсибилизаторов», в диссертационном исследовании представлены новые данные о закономерностях репарации и восстановлении яДНК и мтДНК в различных тканях животных, подвергнутых радиационному воздействию; изучены пути сохранения и стабилизации функций митохондрий и мтДНК в тканях облученных организмов; на основе внеклеточных яДНК и мтДНК в биологических жидкостях предлагается разработка нового неинвазивного быстрого метода оценки клеточной гибели при действии радиации и других генотоксических агентов.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены и представлены на отечественных и международных конференциях: ESF-EMBO Symposium «Spatio-Temporal Radiation Biology: Transdisciplinary Advances for Biomedical Applications» (Sant Feliu de Guixols, Spain, 2009); 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (Prague, Czech Republic, 2009); «38th Annual Meeting of the ERRS» (Stockholm, Sweden, 2010); Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2012 – 2019); «Ломоносов» (Москва, 2014, 2015); «Теоретическая и экспериментальная биофизика» (Пушино, 2013 – 2022); «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014); «VI, VII, VIII Съезды по радиационным исследованиям» (Москва, 2010, 2014, 2021); «Медико-биологические проблемы действия радиации» (Москва, 2012); «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиобиологии» (Санкт-Петербург, 2015); «VI Съезд радиобиологического общества Украины» (Киев, Украина, 2015); «V, VI Съезд

биофизиков России» (Ростов-на-Дону, 2015; Сочи, 2019); «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 2016); «Современные проблемы общей и космической радиобиологии» (Дубна, 2017); «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2018); «Smart Bio» (Kaunas, Lithuania, 2018); «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, 2019); «16th IRR Congress» (Manchester, United Kingdom, 2019); «Современные проблемы радиобиологии» (Гомель, Беларусь, 2021); «American Association for Cancer Research Annual Meeting» (Philadelphia, USA, 2021, 2022); «Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии» (Дубна, 2022).

Результаты исследования получены при выполнении государственных контрактов и грантов, включая программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и грантов РФФИ № 08-04-00163; № 12-04-31089; 13-04-00485; № 12-04-31070; № 16-34-00832; № 17-29-01007.

Личный вклад диссертанта в работу. Соискатель выполнял все этапы диссертационного исследования, включая формулирование цели, задач, положений и выводов, планирование и проведение исследований, статистический анализ и интерпретацию полученных экспериментальных данных. Соискателем подготовлены публикации в отечественные и международные профильные журналы, полученные результаты представлены на конференциях регионального, всероссийского и международного уровней.

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 55-ти печатных работах, из которых – 18 статей в журналах, рекомендуемых ВАК (11 статей в иностранных и 7 в российских) и 37 работ – в материалах российских и международных конференций, съездов и симпозиумов.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа

изложена на 213 страницах, иллюстрирована 3 таблицами и 35 рисунками. Библиографический указатель содержит 443 источника литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Роль мтДНК в функционировании и стабильности клеток млекопитающих при действии ионизирующей радиации

Данный раздел обзора литературы фокусируется на результатах исследований, посвященных изучению повреждений митохондриальной ДНК (мтДНК), индукции окислительного стресса, обусловленного пролонгированной повышенной генерации активных форм кислорода и азота, возможным путям сохранения функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующей радиацией (ИР). Рассматривается возможная роль репарационных и антиоксидантных систем, а также процессов биогенеза, динамики и митофагии в поддержании функционально активных митохондрий в облученных клетках. Функционирование митохондрий тесно связано с целостностью мтДНК, которая играет ключевую роль во многих клеточных процессах. Широкий спектр дегенеративных заболеваний, а также онкогенез и старение ассоциируются с нарушениями в мтДНК. МтДНК и митохондрия в целом все чаще рассматриваются как чувствительные мишени при радиохимиотерапии опухолей. Знание пострадиационных процессов в митохондриях открывает возможные дополнительные подходы к снижению лучевой реакции организма. Повреждения и мутации в мтДНК возникают с большей частотой, чем в ядерной ДНК (ядНК) в клетках, подвергшихся воздействию ИР и других генотоксикантов. С другой стороны, в клетках, облученных в клинически значимых дозах, могут сохраняться функционально активные копии мтДНК. Эта сохранность обеспечивается благодаря наличию в клетке множества копий мтДНК, экранированию их от воздействия активных форм кислорода (АФК) и азота белками в составе нуклеоидов, функционированию системы эксцизионной репарации оснований в митохондриях. Тем не менее, в митохондриях усиливается образование

АФК после облучения клеток. Повышенная генерация АФК в митохондриях может продолжаться порой до нескольких суток после радиационного воздействия. Пролонгированная повышенная генерация АФК, возможно, обусловлена вовлечением в комплексы цепи переноса электронов аберрантных белков, экспрессируемых генами мутантных копий мтДНК. Это может приводить к дополнительным повреждениям ДНК, дисфункции митохондрий, нестабильности ядерного генома. Вместе с тем, антиоксидантные системы митохондрий могут “сдерживать” развитие окислительного стресса. Активация Mn-SOD2 и белка p53 играет ключевую роль в этом процессе. Кроме того, индукция митохондриального биогенеза с синтезом мтДНК, митохондриальной динамики и митофагии может быть сопряжена с развитием окислительного стресса в митохондриях и их дисфункцией в облученных клетках. Таким образом, можно полагать, что, хотя мтДНК характеризуется повышенной частотой повреждений и недостаточно эффективной их репарацией, сохранению митохондриального генома и поддержке функционально активных митохондрий в облученных клетках способствуют следующие факторы: наличие множества копий мтДНК, связанных с белками, индукция антиоксидантной системы, биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК, активация митохондриальной динамики и митофагии.

Митохондрии чаще всего принято рассматривать как “энергетические станции” клеток, обеспечивающие большую часть энергетики, однако функции этих органелл значительно шире. Они играют ключевую роль во многих клеточных процессах, включая регуляцию уровня ионов кальция, биосинтез гема, сборку железо/серных кластеров, развитие различных клеточных ответов на действие физических и химических агентов, апоптоз, иммунный ответ, а также рост и дифференцировку клеток. Для нормального функционирования митохондрий и их биогенеза важно взаимодействие продуктов генов мтДНК и яДНК. С нарушением структуры мтДНК и функций митохондрий ассоциируются широкий спектр дегенеративных заболеваний, дисфункции клеток и тканей, снижение активности

иммунной системы, развитие опухолевых патологий. Роль митохондрий в процессе старения остается темой большого интереса на протяжении многих лет [33-41]. На протяжении многих лет ведутся исследования нарушений энергетического гомеостаза, митохондриальных функций и возможных путей их восстановления в клетках организма, подвергшегося воздействию ионизирующей радиации (ИР). В ряде работ показано снижение митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования в клетках различных облученных организмов [42, 43].

В последнее двадцатилетие, благодаря успехам в области изучения митохондриального генома и применению новых методов, накоплены новые данные, которые позволяют понять механизмы пострадиационных нарушений митохондриальных функций и их роли в развитии лучевой реакции организма. На основе результатов многих исследований в настоящее время мтДНК и сами митохондрии можно рассматривать как чувствительные мишени для ИР и других повреждающих агентов. Поэтому избирательное воздействие на эти структуры, вероятно, является одним из подходов к повышению эффективности радиохимиотерапии опухолей и снижению лучевой реакции организма [33, 39-41].

1.1.1. Структурно-функциональная характеристика мтДНК

МтДНК имеет ряд особенностей, отличных от яДНК, в структурной организации и функционировании. Так, клетки всех высших организмов полиплоидны относительно мтДНК, и большинство соматических клеток млекопитающих содержит сотни митохондрий, а каждая митохондрия содержит от 2 до 10 копий ковалентно замкнутых кольцевых молекул мтДНК [44-46]. Структура, содержание генов и организация мтДНК строго консервативны для всех млекопитающих. У большинства млекопитающих мтДНК составляет 0,1-1,0 % от общей клеточной ДНК, имеет размер около 16,5 т.п.н. (у человека 16569 п.н.) и

является довольно маленьким среди мтДНК эукариот [44, 47, 48]. Митохондриальный геном наследуется по материнской линии [49]. Отцовская мтДНК не оказывает существенного влияния на генотип потомства. Возможно, это связано с тем, что в зрелых сперматозоидах содержатся не более нескольких сот копий мтДНК на одну клетку, тогда как в ооцитах их огромное количество. Так, зрелые ооциты мышей содержат более 150000 копий мтДНК на клетку, в одном ооците человека их количество может достигать до 700 000 копий [50, 51]. Клетки различных тканей имеют разное количество молекул мтДНК, однако число их копий обычно в специфических типах клеток строго сохраняется [52, 53]. В тканях (в том числе постмитотических тканях мозга, сердца, скелетных мышц), в популяциях клеток, независимо от их пролиферативной активности, мтДНК, в отличие от яДНК, может реплицироваться независимо от клеточного цикла в течение всей жизни организма [46, 54]. В клетках млекопитающих для синтеза мтДНК митохондрия запасается пулом более 10% dNTP от их общего внутриклеточного содержания, тогда как количество мтДНК составляет не более 1% общей клеточной ДНК [55]. В митохондриях мтДНК представлена в суперспиральной форме, и хотя не образует нуклеосомные структуры как яДНК в составе хроматина. Группы из нескольких копий мтДНК организованы в нуклеоиды, комплексированные с белками и располагаются в матриксе митохондрия. Нуклеоидные структуры мтДНК преимущественно формируются, связываясь с гистоно-подобными основными белками, а также с белками, участвующими в регуляции транскрипции и репликации мтДНК [56, 57].

Молекула мтДНК млекопитающих и человека содержит 37 генов (Таблица 1). Из них 13 кодируют белки митохондриальной цепи переноса электронов, 22 тРНК и 2 рРНК (16S рРНК и 12S рРНК), необходимые для автономного синтеза этих 13 белков [44, 46]. Структурно-функциональное описание генетической карты мтДНК млекопитающих дается во многих публикациях, она представлена на рисунке 1.

тРНК. Кроме 37 генов, мтДНК содержит маленький сегмент – регуляторный регион. Эта D-петля (D-loop, displacement-loop), у человека она составляет участок длиной 1122 п.о., который начинается и кончается в позициях 16023 и 576 п.о. мтДНК.

D-петля содержит основные регуляторные элементы для репликации и транскрипции. D-петля обладает наибольшей видовой вариабельностью по последовательности и длине, однако, все же содержит некоторые консервативные последовательности, выполняющие, возможно, регуляторные функции [44, 46].

Область D-петли имеет структуру с утроенными нитями ДНК, возникающими в результате синтеза коротких участков Н- нити. Этот участок включает двунаправленные промоторы HSP и LSP для транскрибирования Н и L нитей. Активность обоих HSP и LSP определяется наличием специфических последовательностей, состоящих из 15-нуклеотидов. Кроме того, эти специфические последовательности промоторов служат в качестве сайтов узнавания для митохондриального транскрипционного фактора А (mtTFA). Участок D-петля рассматривается также как место прикрепления мтДНК к митохондриальному матриксу на внутренней мембране и может больше всего подвергаться воздействию АФК и в том числе липидным перекисям. Поэтому участок D-петли, благодаря его структурным особенностям и легкой доступности действию повреждающих агентов, является гипервариабельной областью мтДНК.

Важнейшей характеристикой мтДНК, отличной от яДНК является ее компактная организация, при которой гены, не содержащие интронов, следуют один за другим или же прерываются несколькими нуклеотидами [44, 46, 47]. Другим интересным свойством мтДНК является то, что гены тРНК, распределены между другими генами. Поскольку мтДНК, в отличие от яДНК, не содержит неcodируемые последовательности (за исключением участка D-петли), она транскрибируется как единый полицистронный блок, и любые нарушения в ней могут быть патогенетическими [53, 58].

Вместе с тем, митохондрии имеют ограниченную автономность. Митохондриальный геном может «действовать согласованно» с ядерным геномом, для нормального функционирования митохондрий и их биогенеза.

Белки, участвующие в репликации, репарации и транскрипции мтДНК, кодируются генами ядерного генома [40, 44, 46]. ДНК митохондрий, расположенных вблизи ядра, реплицируется чаще, чем мтДНК периферийных органелл. В то время как репликация яДНК в клетках млекопитающих протекает в ограниченный период клеточного цикла, в S-фазе, репликация мтДНК почти одинакова во всех фазах клеточного цикла. Репликация мтДНК протекает в ассоциации с митохондриальным матриксом двунаправлено по обеим нитям. Точка репликации H-цепи располагается в D-петле, тогда как точка репликации L-цепи располагается за пределами D-петли между генами тРНК цистеина и аспарагина [44, 46, 54]. Полимеризацию мтДНК осуществляет специфическая ДНК-полимераза гамма (DNA-pol γ) [59]. Этот фермент обнаружен у всех позвоночных в виде двух субъединиц: большой каталитической α -субъединицы (125-140 кДа), и малой β -субъединицы (30-45 кДа) участвующей в распознавании праймеров и увеличивающей его процессивность ДНК-полимеразы гамма. Этот фермент также обладает 5'→3' экзонуклеазной активностью (относящейся к α -субъединице), которая обеспечивает точность синтеза мтДНК [59, 60].

Анализ репликативных интермедиатов мтДНК привел к общепринятой модели, согласно которой репликация мтДНК протекает как асинхронный процесс вытеснения одной из цепей ДНК, и происходит с двух независимых ориджинов. Синтез ДНК начинается в точке OH, расположенной ниже LSP в области D-петли, и протекает вдоль родительской L-цепи, образуя дочернюю H-цепь, при этом родительская H-цепь вытесняется. Когда репликация H-цепи доходит до OL, с этой точки начинается репликация L-цепи в противоположном направлении (рис. 1.) [40, 44, 46]. Для начала репликации H-цепи требуется короткий РНК-праймер, который образуется при расщеплении первичного транскрипта L-цепи. Следовательно,

репликация мтДНК тесно связана с ее транскрипцией и зависит от цис- и транс-действующих факторов, необходимых для транскрипции L-цепи. Кроме того, в репликации мтДНК принимают участие и другие цис-действующие факторы. Это консервативные, так называемые CSB (conserved sequences blocks) и как TAS (termination associated sequences) участки Д-петли. Синтез H-цепи прекращается возле последовательности TAS, образуя триплексную структуру Д-петли [54]. У позвоночных, в частности у млекопитающих, ориджин репликации L-цепи находится на значительном удалении от ориджина репликации H-цепи, внутри кластера из четырех тРНК (рис. 1.) Для инициации репликации требуется действие специфичной праймазы, которая синтезирует РНК-праймер, 5'-конец которого расположен в Т-богатой области ориджина. После инициации репликация L-цепи продолжается на всю длину молекулы мтДНК. Процесс репликации всей молекулы мтДНК занимает примерно 1 час, что соответствует скорости полимеризации около 270 нуклеотидов в минуту [46, 61].

После того, как синтез обеих цепей ДНК закончен, дочерняя молекула мтДНК отделяется, и она принимает соответствующее ей суперскрученное состояние [62].

В митохондриях посредством процесса окислительного фосфорилирования синтезируется около 90% всей клеточной АТФ [44, 63]. Цепь переноса электронов, создаваемая продуктами генов мтДНК и генов яДНК (таблица 1) располагается в составе внутренней митохондриальной мембраны.

Вся система окислительного фосфорилирования состоит из пяти много-субъединичных ферментативных комплексов, формируемых продуктами 13 генов мтДНК и 74 генами яДНК [40, 63]. Эти ферментативные комплексы принято называть комплексами I, II, III, IV, V (таблица 1). В состав комплекса I входит семь субъединиц, кодируемых генами NADH дегидрогеназы мтДНК (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6). Комплекс II формируется белками, кодируемыми исключительно ядерными генами. Комплекс III содержит только одну субъединицу, кодируемую геном Cyt b (цитохром b) мтДНК. Комплекс IV включает субъединицы

цитохром С оксидазы (COI, COII, COIII), а комплекс V содержит два продукта генов мтДНК, синтеза АТФ (АТР6 и АТР8), кодируемые генами мтДНК (таблица 1) [40, 64].

Таблица 1. Количество продуктов (N), кодируемых генами мтДНК и яДНК, необходимых для образования АТФ в митохондриях.

Комплексы дыхательной цепи	Наименование генов мтДНК	продукты генов мтДНК (N)	продукты генов яДНК (N)	продукты генов мтДНК и яДНК (N)
I	<i>ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6</i>	7	36	43
II			4	4
III	<i>Cyt b</i> (цитохром <i>b</i>)	1	10	11
IV	<i>COI, COII, COIII</i> (три субъединицы цитохром оксидазы С)	3	10	13
V	<i>АТР6, АТР8</i>	2	14	16
Всего		13	74	87

Таким образом, представленное в кратком изложении описание структурно-функциональной характеристики мтДНК, позволяет предполагать, что радиационный мутагенез митохондриального генома будет реализоваться с определенной специфичностью и внесет существенный вклад в развитие лучевого поражения организма.

1.1.2. Повреждение мтДНК как результат воздействия эндогенных факторов и радиации

В нормально функционирующей клетке мтДНК, как и яДНК, постоянно подвержена окислению, «спонтанной» тепловой и гидролитической деградации [65, 66]. Если уровни структурных изменений, возникающих в результате тепловой деградации и дезаминирования одинаковы в мтДНК и яДНК, то повреждений, индуцируемых окислителями, в мтДНК формируется значительно больше, чем в яДНК [67, 68]. Наибольший вклад в эндогенное повреждение мтДНК вносят АФК, генерируемые в самих митохондриях [69].

Подсчитано, что более 90% потребляемого клеткой млекопитающих кислорода поступает в митохондрии, и до 5% этого кислорода превращается в супероксидные анионы, перекись водорода и другие АФК как побочные продукты окислительного фосфорилирования. Причем образование митохондриального супероксида оценивается до 2% всего молекулярного кислорода, поглощаемого митохондриями [70, 71]. Высокие уровни окисленных белков, липидов и нуклеиновых кислот обнаруживаются в митохондриях млекопитающих при нормальных условиях метаболизма [72]. МтДНК в значительной степени уязвима для АФК, так как она расположена в непосредственной близости от ЦПЭ, а уровни окисленных оснований в мтДНК в 2-3 раза выше, чем в яДНК [73]. Высокие уровни окисленных модификации оснований (8-оксо-гуанина, тимингликоля и др) определяются в клетках человека при нормальных условиях [74]. При взаимодействии АФК с ДНК, как и при воздействии ИИ, образуются разнообразные повреждения, хотя они по химической природе и количественно отличаются. К ним можно отнести модификации оснований, потерю оснований (АП-сайты), односторонние разрывы или более сложные повреждения типа межнитевых поперечных сшивок и двунитевых разрывов. Химические модификации пуринов и пиримидинов, возникающих под действием ИИ и химических окислителей, детально

охарактеризованы [74-78]. Некоторые модифицированные окислением основания нестабильны, и при их отщеплении в ДНК образуются АП-сайты [75, 76]. Наиболее интенсивно изучается пуриновая модификация 8-оксо-дезоксигуанозина (8-оксо dG) в мтДНК. В 1988 г Рихтер и коллеги [79] сообщили, что уровень эндогенно индуцированного 8-оксо dG в мтДНК в 16 раз выше, чем в яДНК. Сообщение получило большой резонанс, и эти результаты были подтверждены в других лабораториях [76, 80]. Так в работе [80] исследовали содержание 8-оксо dG в мтДНК и яДНК, полученных из сердца и мозга 6 видов животных, различающихся сроком жизни от 3,5 до 46 лет. У всех видов животных были обнаружены в 3-9 раз больше содержания 8-оксо dG в мтДНК, по сравнению с яДНК. Содержание 8-оксо dG в мтДНК тканей сердца и мозга всех видов животных коррелировало с продолжительностью их жизни. Это согласуется с мнением о том, что АФК в митохондриях являются, в значительной мере, индукторами повреждений, накапливаемых с возрастом [69, 81, 82]. Было показано, что содержание окисленных аддуктов оснований в мтДНК печени крыс в 10 раз больше, чем в яДНК. Уровень этих повреждений в мтДНК и яДНК старых животных в 2 и 1,5 раз выше соответственно, чем у молодых. В клетках различных организмов, таких как дрожжи, грызуны, человек окислительный стресс ведет к значительному увеличению повреждений мтДНК, относительно яДНК [68, 76].

В мтДНК возникают повреждения больше, чем в соразмерном фрагменте яДНК, не только в результате действия АФК, но и при действии на клетки ИИ, УФ-света, противоопухолевых и противовирусных препаратов. Так, в клетках китайского хомячка V79, обработанных H_2O_2 при концентрациях от 0.1 до 5 mM, начальный уровень частоты односторонних разрывов в мтДНК был более чем в 100 раз выше, чем в яДНК. Наблюдаемый уровень односторонних разрывов мтДНК коррелировал с чувствительностью штаммов клеток китайского хомячка к H_2O_2 [83, 84]. В работе [85] показано, что после воздействия 200 мкМ H_2O_2 на клетки человека регистрируется примерно 4 повреждения на 10 т.п.н. участка мтДНК. В то же время

в яДНК при данных условиях обработки клеток повреждений не выявляется. В ряде исследований было установлено, что повышенный окислительный стресс вызывает увеличение повреждений мтДНК, по сравнению с яДНК, дисфункция митохондрий, гибель клеток и нарушение функции тканей у животных [86-91].

Показано, что нарушение функции митохондрий связано с повреждениями митохондриального генома клеток человека и животных, подвергнутых радиационному воздействию [92-95]. Значительно больше повреждений возникают в мтДНК, чем в соразмерном фрагменте яДНК, и при воздействии на клетки млекопитающих и на мышей ИИ [96-98]. Этот повышенный уровень повреждений в мтДНК, по сравнению с яДНК, облученных клеток, можно полагать обусловлено сочетанным действием АФК, генерируемых в самих митохондриях и индуцируемых ИИ. Было показано, что радиационное нарушение ЦПЭ в митохондриях может привести к увеличению АФК и усилению окислительного стресса [99]. Фибробласты человека лишенные мтДНК (ρ^0) являются радиорезистентными, по сравнению с нормальными клетками. Эти наблюдения позволяют полагать, что клетки с функционально активной дыхательной цепью находятся под большим окислительным стрессом от АФК и они радиочувствительны, чем клетки лишенные мтДНК (ρ^0) [99, 100]. С другой стороны, клетки мутантные по отдельным генам мтДНК обладают высокой чувствительностью к ИИ и антибиотикам, вызывающим повреждения ДНК. Эта чувствительность обусловлена как продукцией АФК повышенного уровня в этих клетках и снижением синтеза АТФ, которая участвует во многих реакциях систем репарации ДНК [101]. При этом изменения экспрессии генов в радиочувствительных мутантных (по генам мтДНК) клетках человека существенно отличаются от таковой в нормальных клетках, после их рентгеновского облучения [102]. Отметим, что индуцируемые радиацией АФК в митохондриях генерируются не только сразу после воздействия ИИ, но и в течение нескольких минут после облучения различных типов клеток человека в диапазоне доз 1-10 Гр. Пострадиационное увеличение АФК не регистрируется в клетках дефектных в

реакциях ЦПЭ в митохондриях (клетки дефектные по генам мтДНК) [103]. Показано также, что генерируемые в митохондриях АФК и индуцируемые ИИ свободные радикалы в результате сочетанного действия способствуют малигнизации эмбриональных клеток мышей [104]. Недавно было показано, что усиление окислительного стресса в митохондриях и увеличение повреждений мтДНК (по формированию 8-оксо-dG) сопровождается нейротоксическим эффектом в клетках нейронов коры головного мозга, подвергнутых воздействию радиочастотного излучения 1800 MHz. [105].

Сравнительный анализ повреждений мтДНК и яДНК клеток, облученных УФ-светом показал, что в обоих типах ДНК пиримидиновые димеры возникают с одинаковой частотой, но так называемые 6'-4'- фотопродукты в мтДНК образуются с вдвое большей частотой, чем в яДНК [106]. УФ-свет, как и другие ДНК-повреждающие агенты, вызывает дисфункцию митохондрий. Это было установлено при облучении УФ-светом (В) кератиноцитов человека [107]. Поврежденные мтДНК и накопление мутантных копий мтДНК в клетках кожи под воздействием солнечного УФ-света играют ключевую роль в развитии рака кожи и старения кожи человека. Содержание поврежденных или мутантных копий мтДНК в клетках кожи человека рассматривается как высокочувствительный биомаркер повреждающего воздействия УФ-света [108].

Еще в ранних исследованиях было показано, что уровень метилирования, наблюдаемый при введении грызунам *N*-метил-*N*-нитрозомочевина и *N*-нитрозодиметиламина, в мтДНК более чем в семь раз выше, чем в яДНК различных тканей этих животных [109, 110]. Некоторые алкилирующие агенты в 10-15 раз больше модифицируют мтДНК, по сравнению с яДНК [111]. В ряде исследований было установлено, что многие агенты (полициклические углеводороды, нитрозоамины, производные цисплатины) предпочтительнее связываются с мтДНК, чем с яДНК тканей животных [112]. Так, полициклические углеводороды, включая бензо[а]пирен и его производные, в 40-90 раз больше связываются с мтДНК, чем с

яДНК [113]. В клетках яичника китайского хомячка уровень аддуктов, образуемых противоопухолевым препаратом цисплатины в мтДНК в 4-6 раза выше, чем в яДНК [114]. Это же соединение в клетках меланомы человека вызывает в 50 раз больше повреждений мтДНК, чем яДНК [115]. В клетках крови человека мтДНК подвергается значительным структурным изменениям, по сравнению с яДНК, в результате действия диметилформамида [116].

Многие исследователи объясняют повышенную повреждаемость мтДНК, по сравнению с яДНК, под действием АФК и экзогенных повреждающих агентов отсутствием гистоновой защиты мтДНК в митохондриях, как у яДНК в составе хроматина [59, 63]. Такая точка зрения представляется недостаточно убедительной, поскольку мтДНК в митохондриях комплексирована с гистоно-подобными основными белками, которые способны экранировать ее от действия различных агентов [117, 118]. Большая часть молекул мтДНК в митохондриях организованы в нуклеоиды—структурные комплексы с белками [117, 119, 120].

Известно, что частота повреждений ДНК в «открытых», активно транскрибируемых участках ядерного хроматина, может быть гораздо выше, чем в участках ДНК в составе неактивного гетерохроматина [121, 122]. Возможно, те «открытые» молекулы мтДНК, которые находятся в процессе репликации или транскрипции, больше подвержены воздействию АФК и экзогенных агентов. Повреждения с повышенной частотой возникают в тех молекулах мтДНК, которые локализованы в непосредственной близости с системой транспорта электронов, где генерируются АФК [123, 124]. При этом с мтДНК непосредственно могут взаимодействовать не только АФК, но и вторичные продукты окисления, например, липидные перекиси. Что касается высокой частоты повреждений мтДНК, по сравнению с яДНК, в клетках, обработанных различными химическими агентами, то это является, скорее всего, результатом более активного проникновения этих соединений из цитоплазмы в митохондрии. Отрицательный мембранный потенциал митохондрий со стороны ее матрикса способствует накоплению липофильных

катионов в этих органеллах. Благодаря этому мембранному потенциалу, митохондрии могут поглощать многие генотоксические ксенобиотики, имеющие положительные заряды из цитоплазмы и концентрировать их до значительных величин [125, 126].

Таким образом, приведенные результаты многих исследований показывают, что мтДНК, в отличие от яДНК, является более уязвимой мишенью для эндогенных АФК и экзогенных повреждающих агентов, поскольку в митохондриях генерируется большое количество АФК и они способны накапливать генотоксические ксенобиотики [127]. В мтДНК клеток тканей животных, подвергнутых радиационному воздействию, образуются больше повреждений, чем в соразмерном участке яДНК, и можно предполагать, что в митохондриальном геноме формируются мутаций с повышенной частотой.

1.1.3. Репарация и мутагенез мтДНК

Возникновение повреждений в мтДНК с более высокой частотой, чем в яДНК, позволяет предполагать, что с эволюционной точки зрения, митохондрии должны были бы иметь активные системы репарации. Однако следует иметь в виду, что для репарации мтДНК все необходимые ферменты и другие компоненты систем репарации, кодируемые ядерными генами, должны поступать в митохондрий. Как известно в клетках высших организмов функционируют системы репарации ДНК разной степени сложности, в зависимости от типа репарируемых повреждений, и в эти системы вовлечены продукты более чем 130 генов [128-130]. Анализ многочисленных данных, посвященных исследованию репарации мтДНК, позволяет заключить, что в митохондриях клеток млекопитающих полностью функционируют только те репарационные системы, которые имеют ограниченный набор ферментов [13, 14, 131].

В клетках млекопитающих основной вклад в репарацию УФ-повреждений ДНК вносят система эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН), в которой участвуют продукты около 30 генов [132]. Однако система ЭРН не функционирует в митохондриях [133]. Поскольку для полной реализации механизма ЭРН требуются продукты большого количества генов, очевидно, они не все импортируются в митохондрии. Вместе с тем, доказано, что в митохондриях клеток человека и животных полностью функционирует система эксцизионной репарации оснований (ЭРО), хотя менее эффективно, чем в ядрах. Ферменты ЭРО вносят вклад в снижение частоты мутаций мтДНК, возникающих за счет модифицированных оснований [14, 134]. Известно, что ЭРО реализуется в клетках двумя путями: с короткой заплаткой и длинной заплаткой в репарируемой ДНК. Результаты исследований показывают, что в митохондриях ЭРО реализуется именно с короткой заплаткой [134]. Для репарации модифицированных окислением оснований мтДНК в митохондриях требуются, по крайней мере, четыре фермента: ДНК-гликозилаза, АП-эндонуклеаза, ДНК-полимераза γ и ДНК-лигаза [135].

Кроме ЭРО в митохондриях млекопитающих выявлены и другие системы репарации ДНК. Доказано, что эти органеллы обладают системой репарации неспаренных оснований [136]. В митохондриях млекопитающих обнаружены белки, удаляющие ошибочную пару с 8-оксо dG и неправильные пары типа GT и GG в ДНК, обнаружен ряд белков, участвующих в рекомбинационной репарации [14, 137, 138]. Однако, реализация полного механизма репарации двунитевых разрывов, поперечных сшивок ДНК или сложных аддуктов, индуцируемых радиацией и химическими канцерогенами, еще недостаточно выяснена.

Таким образом, процессы репарации ДНК в митохондриях клеток млекопитающих функционируют недостаточно эффективно, по сравнению с таковыми в ядрах. Хотя система ЭРО полностью представлена в митохондриях, удаление модифицированных окислением оснований из мтДНК происходит медленнее, чем из яДНК [139]. Так, в клетках, обработанных перекисью водорода,

повреждения мтДНК сохраняются значительно дольше, чем в яДНК [83] и в клетках тканей гамма-облученных мышей кинетика репарация повреждений в мтДНК существенно ниже, чем таковой в яДНК [21].

О низкой эффективности функционирования системы ЭРО в митохондриях млекопитающих свидетельствует множество данных, указывающих на накопление нерепарированных повреждений в мтДНК с возрастом организма [63, 82, 140]. Многие из этих повреждений являются мутагенными и вносят вклад в возникновение митохондриальной дисфункции, в развитие нестабильности генома, канцерогенеза, кардиопатии, старения и других патологий [40, 91, 140-142]. Митохондриальная ДНК-полимераза γ (Pol- γ) также вводит значительное число мутаций, когда реплицируется участок ДНК-матрицы с повреждениями [59, 143].

С другой стороны, было показано, что биосинтез мтДНК в клетках и тканях млекопитающих, подвергнутых радиационному воздействию, не подавляется тогда, когда в этих же условиях происходит блокировка репликации яДНК [16, 144]. Синтез мтДНК в гамма-облученных клетках может продолжаться, хотя происходит одновременная ее пост-радиационная деградация до 50% с выраженной митохондриальной дисфункцией [97]. В ряде исследований, выполненных на клетках *in vitro* и на грызунах было показано, что через несколько часов, после воздействия ИИ или окислительного стресса, в клетках и тканях наблюдается резкая активация биогенеза митохондрий и увеличение числа копий мтДНК (за счет индукции репликативного синтеза мтДНК) [21-23, 145-147]. Пострадиационное увеличение числа копий мтДНК, путем активации репликативного синтеза, рассматривается как развитие компенсаторной реакции в этих клетках и тканях, в связи повреждением конститутивного пула молекул мтДНК [148, 149].

Как известно, при повреждении яДНК в клетке ее репликация блокируется индуцибельной системой контроля точек хода клеточного цикла (cell cycle checkpoint) до завершения репарации [150, 151]. Как было отмечено, в тканях (головного мозга, сердца, скелетных мышц), в популяциях клеток, независимо от их

пролиферативной активности и клеточного цикла, мтДНК, в отличие от яДНК, может реплицироваться [46, 54]. Более того, как указывают многие данные, после радиационного повреждения мтДНК в клетках ее синтез не подавляется, хотя частота повреждений в ней может быть выше по сравнению с яДНК. В митохондриях контрольные механизмы (checkpoint) задержки репликации поврежденной ДНК до завершения ее репарации не срабатываются [152]. Результаты этих исследований указывают, что индуцибельная система проверки хода клеточного цикла явно не оказывает влияние на синтез мтДНК в облученных клетках. Хотя другие данные указывают, радиационная активация системы контроля точек клеточного цикла может оказывать влияние на функции митохондрий в радиочувствительных клетках рака поджелудочной железы [153]. Можно полагать, что отсутствие блокировки репликации поврежденной мтДНК в значительной мере будет способствовать формированию в ней мутаций с повышенной частотой, чем в яДНК.

Нерепарированные или ошибочно репарированные повреждения мтДНК в последующих кругах репликации будут реализовываться в точечные мутации и делеции митохондриального генома. Известно, что возникновение делеций мтДНК в основном происходит в процессах ее репарации и репликации [154, 155]. Более высокая частота точечных мутаций и делеций мтДНК, по сравнению с яДНК, наблюдается и в клетках периферической крови людей, подвергшихся воздействию низкоинтенсивным ИИ и у пациентов при проведении радио-химиотерапии опухолей [25, 26, 156]. Однако, результаты анализов мутаций в гипервариабельном участке D-петли мтДНК клеток крови у 10 людей - профессионалов ядерного производства показывают, что уровень гетероплазмы мтДНК у этих работников существенно не отличается от таковой контрольной группы. [28]. Эти работники ядерного производства более 20-37 лет подвергались хроническому радиационному воздействию (накопленная доза >0.9 Sv), но прекратили работу на этом предприятии 10-26 лет назад к времени проведения этих анализов. Возможно, разницу в уровне

гетероплазмии мтДНК у представителей этих двух групп трудно выявить, поскольку обе они состояли из 67-81-летних курящих доноров. Можно также предполагать, что копии мтДНК, несущие мутации, подверглись селективному удалению в процессе пролиферации и обновления клеток периферической крови в течение 10-26 лет после ухода этих работников с предприятия [28, 157]. Анализы частоты точечных мутаций и делеций мтДНК в клетках крови людей в отдаленные сроки после хронического воздействия на них радиации в условиях испытаний ядерного оружия [29] выявили, что по этим показателям обследуемые группы индивидуумов не отличались от контрольных групп. Не удалось выявить существенного увеличения частоты мутаций мтДНК у полевок, подвергавшихся хроническому облучению в зоне аварии Чернобыльской АЭС [27]. Вместе с тем, после содержания лабораторных мышей в специальном помещении с повышенным радиационным фоном (в г. Чернобыли) в течение 30-40 дней наблюдается увеличение гетероплазмии мтДНК в тканях этих животных по сравнению с контрольной группой [158].

В мтДНК возникают делеции разного размера. Большие делеции могут возникать при регионах с «горячими точками» [159]. Формирование этих делеций регистрируется как со старением организма, так и при действии внешних генотоксических агентов. Молекулы с делециями, у которых сохранились последовательности начала репликации, способны к репопуляции быстрее, чем нормальные молекулы мтДНК [40, 63]. На гамма-облученных культивируемых клетках было также продемонстрировано образование больших делеций мтДНК ($\Delta 4977$ мтДНК) [24, 160, 161]. Причем частота индуцируемых делеций мтДНК коррелировала с активностью репарационных систем и радиочувствительностью клеток [160, 161]. Формирование больших делеций мтДНК также регистрируется в клетках периферической крови пациентов после радио-химиотерапии опухолей [26, 156].

Таким образом, на основе имеющихся литературных данных можно полагать, что повышенный уровень повреждений мтДНК, низкая эффективность систем их

репарации в митохондриях, отсутствие блокировки репликации поврежденной мтДНК и постоянное функционирование репликационной машины в этих органеллах, не зависимо от клеточного цикла приводит к закреплению в мтДНК точечных мутаций и делеций.

В литературе имеются огромное количество публикаций (в том числе обзоров), посвященных анализу многих патологий связанных с мутаций мтДНК. Потеря или нарушение экспрессии митохондриальных генов ведет к снижению интенсивности окислительного фосфорилирования, увеличению образования АФК и повышению уровня последующих повреждений мтДНК. С возникновением митохондриальной дисфункции связаны активация клеточной гибели, ослабление функций тканей, развитие дегенеративных процессов, «митохондриальных» заболеваний, включая нейродегенеративные, нейромышечные и ишемические и др. «Митохондриальные» болезни строго коррелируют с уровнем мутирования мтДНК в тканях пациентов [35, 162]. Аномалии в структуре мтДНК сопровождаются клеточной гибелью, усилением старения, снижением активности иммунной системы, они характерны для болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, для сахарного диабета и других патологий [163-168]. Имеется большое количество данных, свидетельствующих о связи гетероплазмии мтДНК с развитием опухолевых патологий [142, 169, 170].

Однако результаты исследований по мутагенезу мтДНК в клетках тканей после радиационного воздействия, на уровне целого организма, ограничены и противоречивы. Это, прежде всего, требует проведение комплексного экспериментального исследования по анализу формирования мутаций мтДНК в клетках тканей облученных животных и по определению судьбы мутантных копий мтДНК в пострadiaционный период.

1.1.4. Генерация АФК в митохондриях клеток после воздействия радиации

Митохондрии являются главным источником АФК (примерно 90%) в клетках млекопитающих [171, 172]. АФК образуются в них как вторичные продукты в реакциях комплексов дыхательной цепи. Супероксид анион ($O^{\bullet-}_2$) является наиболее активным среди них. – преобразуется супероксид дисмутазой в H_2O_2 , которая в свою очередь может генерировать другие АФК по следующим реакциям ($O^{\bullet-}_2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-$; $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{3+}$) [171-173]. Митохондрии являются также источниками активных форм азота. Образование $\bullet NO$ катализирует фермент семейства синтаз окиси азота (NOS), с использованием L-аргинина в качестве субстрата [174]. Взаимодействие $NO\bullet$ с $O^{\bullet-}_2$ ($NO\bullet + O^{\bullet-}_2 \rightarrow ONOO^-$) образует высоко реактивный пероксинитрит ($ONOO^-$), который может генерировать в дальнейшем гидроксильные радикалы ($\bullet OH$) [171, 174]. Все АФК могут вызвать повреждения ДНК, белков и липидов не только в митохондриях, но и во всей клетке [171, 175, 176]. Однако АФК являются не только повреждающими агентами, но и посредниками множества процессов, включая клеточную адгезию, апоптоз, аутофагию и иммунный ответ, а также дифференцировку клеток. АФК могут выступать в качестве вторичных мессенджеров по экспрессии митохондриальных и ядерных генов и модуляции метаболитов. АФК участвуют в клеточных сигнальных механизмах, в регуляции транскрипции и клеточной пролиферации. Они могут изменять клеточные функции, оказывая влияние на активность множества белков, в том числе – протеинкиназ, фосфатаз, и ряда транскрипционных факторов [33, 171, 176]. Изменения концентрации АФК в сторону увеличения или уменьшения имеют серьезные последствия для клеток. Это в значительной мере зависит от сохранения баланса АФК с антиоксидантными системами митохондрий и клеток. Снижение активности антиоксидантных систем неизбежно приводит к окислительному стрессу. С другой стороны, избыточная активация антиоксидантных систем может резко снизить уровень АФК и привести к отрицательным последствиям для клетки.

Поэтому сохранение в митохондриях хрупкого баланса между уровнями генерируемых АФК и различных эндогенных антиоксидантов необходимо для нормального функционирования клеток, а значит тканей и органов [177, 178].

Если в нормальных условиях генерация АФК в клетках происходит с регулируемой и контролируемой скоростью, то при воздействии ИР в них возникают коротко живущие свободные радикалы и АФК, прежде всего, в результате ионизации молекул воды. Свободные радикалы и перекиси, индуцированные радиацией, чрезвычайно быстро взаимодействуют с клеточными мишенями молекулами и вызывают у них повреждения. Тем не менее в настоящее время становится все более очевидным, что вслед за взаимодействием первичных свободных радикалов и других АФК с мишенями молекулами в облученных клетках, через несколько минут наблюдается активация повышенного производства АФК в этих клетках. Этот повышенный уровень АФК может сохраниться от нескольких минут до нескольких суток, в зависимости от типа клеток и дозы их облучения [179, 180].

Следует отметить, что много лет назад, рассматривая проблему развития свободно радикальных процессов в облученных клетках, А.М. Кузин писал: “Вслед за первой, физической стадией наступает вторая – химическая. Если первоначальное число возникших радикалов на органеллу (например, на митохондрию) исчислялось величиной порядка 900, то быстро протекающие цепные реакции окисления могут привести к появлению многих тысяч измененных молекул, что неизбежно приведет к нарушениям физико-химических и функциональных свойств этих структур” [42].

В настоящее время, на основе многих экспериментальных данных, получила развитие гипотеза о роли активации производства АФК и пролонгированного сохранения окислительного стресса в возникновении нестабильности генома в облученных клетках, а также в соседствующих с ними необлученных клетках [54, 88, 177, 181]. Растущий объем данных литературы указывает, что источником резкого вторичного повышения АФК в клетках, подвергшихся радиационному

воздействию, являются митохондрии. АФК, генерируемые в этих органеллах, могут проникать в цитоплазму и ядро клетки. Это удастся регистрировать с помощью красок, способных проникать в клеточные компартменты и флуоресцирующих при их непосредственном взаимодействии с АФК [182, 183]. Механизмы пролонгированной активации образования АФК в митохондриях клеток, подвергшихся воздействию ИР, недостаточно ясны, но имеющиеся данные литературы позволяют предполагать, что эта активация, в первую очередь, связана с повреждением мтДНК, возникновением в ней точечных мутаций, делеций и с экспрессией аберрантных белков – компонентов комплексов ЦПЭ. Так, в исследованиях Лич (Leach) и др. [103, 184] показано, что в течение нескольких минут после воздействия радиации в диапазоне доз 1–10 Гр, активация генерации АФК (от 20 до 80%) наблюдается во многих типах клеток, за исключением клеток, лишенных мтДНК (ρ^0 клетки). Пострадиационная активация образования АФК ингибируется при гиперэкспрессии Ca^{2+} -связывающего белка (кальбиндина 28К) или после обработки клеток (до облучения) хелатором внутриклеточного Ca^{2+} . Повышенная генерация АФА в облученных клетках сопряжена так же с активацией изоформы NO-синтазы (NOS-1) [184].

Сравнительные анализы радиочувствительности трех линий фибробластов человека показали, что клетки, лишенные мтДНК (ρ^0), обладают повышенной радиорезистентностью по сравнению с нормальными (ρ^+) клетками. Выявлено, что клетки, лишенные мтДНК, подвергаются апоптозу при более высоких дозах ИР, чем клетки, содержащие нормальный уровень копий мтДНК [99, 100, 185]. Значительные различия между клеточными линиями ρ^+ и ρ^0 по радиочувствительности (способности к формированию колоний), по частоте индуцированных микроядер, а также по уровню генерации АФК были выявлены в экспериментах с клетками остеосаркомы (ρ^0 и ρ^+ клетки) и с фибробластами человека. Результаты показали, что в клетках, лишенных мтДНК, по сравнению с нормальными клетками частота микроядер значительно ниже, а дополнительная активация генерации АФК в

митохондриях этих клеток не регистрируется [186, 187]. Последующие исследования выявили, что в клетках человека и животных с повреждением мтДНК пострадиационная активация генерации АФК сопряжена с возникновением стойкого окислительного стресса, увеличением мембранного митохондриального потенциала, нарушением митохондриального дыхания, синтеза АТФ и ферментов в комплексах ЦПЭ. Эти нарушения способствуют подавлению системы контроля точек клеточного цикла, накоплению клеток в *G2/M* фазе [180, 187, 188], увеличению частоты хромосомных aberrаций [189] и фокусов γ H2AX, характеризующих критические повреждения ядерной ДНК [180], возникновению долговременной нестабильности генома [88].

Многие “митохондриальные болезни” обусловлены мутациями в генах мтДНК [33, 35, 36, 40]. Ряд исследований показывает, что для клеток человека и животных с точечными мутациями и делециями в мтДНК характерно повышенное образование АФК, усиливающих окислительный стресс [190-193]. Такие клетки имеют повышенные уровни модификации цитоплазматических белков и количества 8-окси-дезоксигунина в ДНК.

После радиационного воздействия выявлены индукция нестабильности генома ядра, увеличение частоты апоптоза и трансформации только в популяции клеток, имеющих мутации в мтДНК, что не отмечено для нормальных клеток, облученных в тех же дозах [101, 102, 194-197].

Индукция нестабильности генома и развитие опухолевой трансформации в популяции этих клеток обусловлены развитием в них окислительного стресса [196, 197]. Так, показано, что после воздействия рентгеновского излучения (0–4 Гр) экспрессия всех белок-кодирующих генов мтДНК в клетках людей с митохондриальными болезнями (синдром Лея и атрофия зрительного нерва Лебера) количественно отличается от таковой в нормальных клетках. Обе линии клеток с мутациями в мтДНК проявляют повышенную частоту хромосомных aberrаций и радиочувствительность по сравнению с нормальными клетками [101, 102]. Однако

клетки пациентов с синдромом Лея обладают наибольшей радиочувствительностью. Последнее связано с тем, что в клетках, имеющих мутацию мтДНК в гене *ATPase6*, нарушена репарация повреждений ДНК в результате снижения синтеза АТФ [102].

Результаты, полученные на клетках человека с митохондриальными болезнями, согласуются с данными экспериментов на клетках грызунов. Так, трехкратное увеличение уровней H_2O_2 наблюдается в фибробластах хомячка с мутацией в гене мтДНК, кодирующем субъединицу *c* сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [194]. Кроме того, выявлена повышенная гибель этих мутантных клеток (по сравнению с “контрольными” родительскими клетками), подвергшихся воздействию радиации с низкой ЛПЭ в диапазоне малых доз 5–50 сГр. Стабильная экспрессия мутантного гена СДГ в клетках сопровождается значительным увеличением частоты мутаций мтДНК, а также 70-кратным увеличением частоты мутационных изменений в локусе HPRT ядерного генома. Наконец, снижение глутатиона в этих клетках на 95% (эксперименты с использованием L-бутионин-[S, R]-сульфоксимины), привело к 4-кратному увеличению частоты мутаций мтДНК [195, 197].

Таким образом, анализ данных современной литературы показывает, что воздействие ИР на клетки, приводит к повышенной индукции мутагенеза мтДНК. Изменение экспрессии мутантных генов мтДНК с синтезом дефектных белков системы ЦПЭ способствует “перепроизводству” АФК, которые усиливают окислительный стресс и дальнейшее повреждение мтДНК в облученных клетках. Это может приводить к дисфункции митохондрий (развитие “порочных кругов”), дополнительному повреждению яДНК и нестабильности генома у потомства выживших клеток. Возможно, длительное сохранение повышенного уровня АФК в облученных клетках играет важную роль в процессе онкогенеза.

1.1.5. Антиоксидантная защита в митохондриях облученных клеток

Несомненно, развитие пролонгированного окислительного стресса в митохондриях в значительной мере сдерживают антиоксидантные системы, нейтрализующие АФК. Как известно, митохондрии, и клетки в целом, обладают сложной многоуровневой системой антиоксидантной защиты, включающей множество ферментов и низкомолекулярных соединений, которые снижают повреждающие действия АФК на клеточные макромолекулы [33, 40, 176, 198, 199].

Множество сведений о синтетических и природных радиопротекторах, снижающих количество повреждений, индуцируемых свободными радикалами и АФК в облученных клетках, представлено в литературе. В данном обзоре рассмотрены результаты, касающиеся роли антиоксидантных ферментов и, прежде всего, супероксиддисмутаза (SOD) в регуляции уровня АФК в митохондриях и в сохранении функции этих органелл в клетках, подвергшихся воздействию ИР.

Клетки млекопитающих содержат группу антиоксидантных ферментов, и среди них – три изоформы SOD, которые переводят высоко реакционный $O_2^{\bullet -}$ в H_2O_2 . SOD1 медь цинк зависимая (Cu-Zn-SOD) локализована в митохондриях и в цитозоле, SOD2 марганец зависимая (Mn-SOD) локализована только в митохондриях, и SOD3 является внеклеточным ферментом (Cu-SOD) [199, 200]. Удаление $O_2^{\bullet -}$ с помощью SOD приводит к снижению количества и других типов АФК, в частности, предотвращается переход $NO^{\bullet}$ в $ONOO^-$. Образовавшиеся молекулы перекиси водорода, в результате действия SOD, могут быть превращены в H_2O посредством глутатион пероксидазы или могут быть диффундированы в другие органеллы клетки [201]. Разрушение H_2O_2 в цитоплазме происходит с участием каталазы и других антиоксидантных ферментов [171, 201]. Из группы антиоксидантных ферментов SOD2 можно рассматривать как основной детоксикатор, поскольку она локализована на матриксе митохондрии и ассоциирована с мтДНК как компонента нуклеоида [202]. Активность этого

фермента в митохондриях поддерживает необходимый уровень АФК, участвующих в регуляции различных метаболических процессов в клетках [199]. Так, мыши, с нокаутом гена, кодирующего SOD2, не способны давать жизнеспособное потомство [203, 204]. С другой стороны, мыши с гиперэкспрессией SOD2 имеют снижение рождаемости и аномалии в развитии потомства, но, вместе с тем, у них снижена частота опухолеобразования [205, 206]. Мыши с дефектом по гену, кодирующим фермент SOD1, локализуемый в компартментах митохондрий и цитоплазмы, характеризуются выраженным окислительным стрессом в тканях и сокращенной продолжительностью жизни [207].

В настоящее время результаты многих исследований указывают на то, что ферменты SOD, локализованные в митохондриях, обеспечивают значительную защиту клеток от повреждающего действия ИР в условиях *in vitro* и *in vivo* [208-213]. Избыточная активность SOD2, создаваемая гиперэкспрессией этого белка, повышает радиорезистентность клеток млекопитающих [183, 209, 211]. Радиозащитные эффекты митохондриальной SOD2 или SOD1 исключительно связаны со снижением уровня свободных радикалов и АФК в митохондриях облученных клеток. Снижение уровня АФК и, соответственно, уменьшение количества поврежденных макромолекул (мтДНК, белков, липидов) способствует сохранению митохондриальных функций, в частности, обеспечение синтеза АТФ, необходимой для репарации ДНК облученных клеток [88, 183, 214, 215].

Вклад митохондриальных ферментов SOD в радиорезистентность клеток млекопитающих хорошо продемонстрирован в ряде исследований. Так, показано, что частоты индуцированных повреждений яДНК и злокачественной трансформации облученных мышинных фибробластов, имеющих гомозиготный мутантный генотип по гену SOD2 ($-/-$), в 5 раз превышают таковые показатели для клеток с генотипом дикого типа SOD2 ($+/+$) [216]. Значительное увеличение уровня АФК наблюдалось в клетках SOD2 ($-/-$) на 72-й час после их облучения, по сравнению с SOD2 ($+/+$) клетками. Длительное накопление АФК в клетках SOD2 ($-/-$) сопровождается

увеличением частоты микроядер [216]. Однако введение в фибробласты, до их облучения, SOD1 и каталазы (соединенных с полиэтиленгликолем), или же при активации гиперэкспрессии в них SOD2 (введение посредством аденовируса), приводило к значительному повышению радиорезистентности этих клеток. Повышение концентрации SOD2 или каталазы, путем их введения в фибробласты до облучения клеток, сопровождалось снижением частоты радиационно-индуцированных мутаций мтДНК на 50%. Одновременное повышение активности каталазы и SOD2 в этих клетках приводило к снижению частоты мутаций в мтДНК на 90% [194, 197]. Клетки с гиперэкспрессией SOD1 также проявляют радиорезистентность, по сравнению с клетками, имеющими генотип дикого типа. Выявлен повышенный уровень АФК в течение 8 дней после воздействия радиации на клетки глиомы человека с нормальным уровнем активности фермента SOD1. Однако в таких же клетках с гиперэкспрессией SOD1 накопление АФК было подавлено в течение пострadiационного периода [217]. Недавнее исследование Хосоки (Hosoki) и др. [183] показало, что две линии клеток HeLa с гиперэкспрессией SOD2 проявляют радиорезистентность не только по тесту клеточной выживаемости. Показано, что эти клетки, подвергшиеся воздействию радиации, имеют низкий уровень АФК в митохондриях и малое количество фокусов γ H2AX в ядрах, по сравнению с “контрольными” облученными клетками. Эти результаты указывают на то, что SOD1 и SOD2 в митохондриях подавляют уровень АФК и способствуют сохранению функции этих органелл в облученных клетках.

Повреждения ДНК и других клеточных макромолекул в облученных клетках приводят к запуску различных сигнальных механизмов, активирующих целый каскад метаболических реакций. Усиление генерации АФК в митохондриях клеток после воздействия ИР можно рассматривать как чувствительный узел этого каскада, включающий активацию антиоксидантных ферментов и образование низкомолекулярных перехватчиков АФК.

Изменение экспрессии (активация или подавление) нескольких тысяч белков можно наблюдать в облученных клетках, что зависит от дозы радиационного воздействия и времени, прошедшем после облучения [218-220]. SOD2 относится к таким белкам, экспрессия которых активируется в клетках после действия ИР. Радиационно-индуцированная активация SOD2 установлена в культивируемых клетках животных и человека, а также в тканях грызунов [221-226]. Активация SOD2 рассматривается как важнейшее звено всего комплекса радиоадаптивной реакции клетки на воздействие радиации в малых дозах [224-226]. Пострадиационная активация SOD2 в клетках имеет дозо-зависимый характер, однако избыточная активность SOD2, снижая уровень АФК, может подавлять и развитие АФК-зависимых сигнальных реакций [226]. Так, исследования с использованием ДНК-микрочипов показали, что в необлученных клетках с повышенной активностью этого фермента наблюдается такое же повышение активации экспрессии генов (около 295 генов), какое выявляется в нормальных клетках, облученных в дозе 5.5 Гр. Радиационно-индуцированное повышение активации экспрессии коснулось, наряду с SOD2, нескольких групп транскриптов, оказывающих влияние на радиочувствительность клетки, в том числе GADD45, циклина А, циклина В1, p21, Мус, гомолога RAS, рецептора фактора некроза опухоли, NfκB, глюкокортикоидного рецептора и ГТФ связывающих белков [183]. Экспрессия этих генов снижается с падением уровня АФК [88, 183, 208, 226]. Эти результаты показывают, что SOD2, превращая $O\bullet_2$ в H_2O_2 снижает окислительный стресс в митохондриях и оказывает регуляторное влияние на экспрессию других генов, контролирующих радиочувствительность клеток. Кроме того, следует иметь в виду, что АФК являются мощными активаторами белка p53 [227].

Белок p53 локализуется в митохондриях, модулирует митохондриальное дыхание, мутагенез мтДНК и является одним из ключевых регуляторов функции митохондрий, в том числе, количества генерируемых АФК [228]. Функционирование белка p53 сопряжено с репарацией и репликацией поврежденной мтДНК и

активацией митохондриального биогенеза [41]. Белок p53, регулируя, прямо или косвенно, огромное количество генов, вовлечен в многочисленные ключевые процессы клетки [229], в том числе в стабилизацию и сохранение мтДНК. Механизм, посредством которого белок p53 регулирует клеточный ответ на возникновение в митохондриях окислительного стресса, зависит от уровня АФК. Дефектные по p53 клетки мышей содержат малое количество копий мтДНК и митохондриальной массы, и в них нарушено соотношение $O^{\bullet-}_2/H_2O_2$ [230]. Белок p53 оказывает влияние на функции транскрипционных факторов, которые неразрывно связаны с регуляцией производства АФК, активирует экспрессию генов SOD2, глутатион пероксидазы, альдегиддегидрогеназы 4, контролирующих уровень АФК [231-233]. Следовательно, функции “стража генома” – белка p53 также связаны с сохранением и нормальным функционированием митохондрий [234].

Таким образом, совокупность приведенных данных указывает, что после первичных свободных радикалов, индуцируемых воздействием ИР, в митохондриях облученных клеток активируется процесс длительного пострадиационного производства АФК, приводящих к усилению окислительного стресса, к возможной дисфункции самых органелл и нестабильности генома. Антиоксидантные системы в самих митохондриях, прежде всего активация ферментов SOD, противостоят развитию этих процессов. Однако, на данном этапе развития лучевой реакции организма, клетки нуждаются в экзогенной поддержке по усилению или активации антиоксидантных систем для обеспечения их выживаемости и для снижения нестабильности генома.

1.1.6. Биогенез, динамика и митофагия митохондрий

Как отмечено выше, дисфункции митохондрий могут проявляться в полную силу при увеличении количества мутантных копий мтДНК до 50–60%. Вместе с тем

результаты радиобиологических исследований свидетельствуют о том, что активация пролонгированной генерации АФК может иметь место и при воздействии на клетки радиации в малых дозах и, возможно, при небольшом количестве мутантных копий мтДНК. Длительное сохранение повышенной генерации АФК в митохондриях может способствовать дальнейшему увеличению числа мутантных копий мтДНК, возникновению нестабильности генома и развитию дисфункции этих органелл. Митохондрии с большим количеством мутантных копий мтДНК, которые способствуют образованию повышенного уровня АФК и развитию окислительного стресса, вряд ли способны поддерживать нормальную жизнедеятельность клетки. Возможно поэтому, наряду с активацией антиоксидантных систем клетки, постоянное обновление митохондриальных компонентов и самих митохондрий имеет решающее значение для поддержания функциональной активности этих органелл в клетках, не только после воздействия ИР, но и, очевидно, с возрастом организма. Активацию биогенеза, динамики митохондрий, а также митофагии (избирательного удаления поврежденных органелл) можно рассматривать как важнейшие процессы, направленные на сохранение и стабилизацию множества метаболических реакций, зависимых от функционирования митохондрий, после воздействия на клетки ИР и других повреждающих агентов.

Биогенез митохондрий. Хотя копии мтДНК в митохондриях, казалось бы, присутствуют в избытке, сохранение необходимого количества нормальных молекул мтДНК или “дозы генов” – жизненно важно для обеспечения нормальных функций митохондрий в клетках. Активация митохондриального биогенеза (с синтезом мтДНК) наблюдается в тканях человека как ответ на воздействие ряда физиологических раздражителей, при острых травмах, воспалительных процессах, выполнении физических упражнений, простудных реакциях и ограниченном количестве полученных калорий. Это уникальный механизм метаболической адаптации организма к неблагоприятным условиям среды и хроническим воздействиям повреждающих агентов [148, 235, 236]. Уже упоминалось, что в

митохондриях возникает широкий спектр изменений, включая повреждения мтДНК, липидов и белков, снижение дыхательных функций при воздействии (в зависимости от дозы) на организм ИР, что в конечном итоге приводит к нарушению энергетического гомеостаза клеток и тканей. При этом следует иметь в виду, что в облученных клетках инициируется ответ на повреждение ядерного генома, сопровождаемый активацией репарации ДНК, экспрессией множества генов и различными формами клеточной гибели [237, 238]. Эти процессы представляются энергозависимыми. Огромная дополнительная потребность возникает в энергообеспечении многих “внеплановых” процессов в облученных клетках, на фоне нарушенного окислительного фосфорилирования в митохондриях. В связи с этим активация биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК является ожидаемой реакцией клеток, подвергшихся радиационному воздействию. Поэтому пострadiационная активация биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК в облученных клетках рассматривается как развитие компенсаторной реакции [148, 149].

Биогенез митохондрий и его регуляция представляет довольно сложный процесс, в который вовлечены продукты более 1000 генов, при скоординированном взаимодействии ядерного и митохондриального геномов. Митохондриальный биогенез сопровождается развитием следующих процессов: синтезом компонентов митохондриальных мембран и белков, кодируемых ядерным геномом, и их доставкой в митохондрии, а также репликацией мтДНК и синтезом белков, кодируемых генами мтДНК [236, 239].

Результаты многих исследований показывают, что количество копий мтДНК, как и биогенез митохондрий, определяются энергетическими потребностями клеток и тканей и модулируются метаболическими сигналами и внешними стимулами, хотя механизмы регуляции этих процессов остаются недостаточно ясными. В качестве важнейших регуляторов активации репликации мтДНК и митохондриального биогенеза рассматриваются транскрипционные коактиваторы PGC-1 α и PGC-1 β , которые вызывают экспрессию генов ядерных дыхательных факторов NRF-1 и NRF-

2. В свою очередь, NRF-1 и NRF-2 контролируют экспрессию митохондриальных транскрипционных факторов mtTFA (TFAM), mtTFB-1 и mtTFB-2. Транскрипционный фактор TFAM играет ключевую роль не только в регуляции транскрипции мтДНК, но и в ее стабилизации и инициации репликации [239, 240, 241].

Ряд исследований подтверждает, что после повреждения мтДНК и усиления окислительного стресса в клетках активируется биогенез митохондрий и репликация мтДНК. Показано, что обработка фибробластов легкого человека перекисью водорода или сульфоксимином бутионина в низких концентрациях приводит к увеличению количества мтДНК и митохондриальной массы в этих клетках через 24–72 ч после перенесенного воздействия [242]. Аналогичные результаты были получены и на клетках-цибридах, содержащих копии мтДНК с общими делециями [243]. В этих клетках увеличение количества копий мтДНК и митохондриальной массы сопровождалось повышением производства АФК, частоты мутаций мтДНК, увеличением содержания 8-оксо-dG в мтДНК и липидных перекисей в клетках. Усиление окислительного стресса в этих клетках привело к 3-кратному увеличению количества копий мтДНК, а также повышению TFAM и ядерного дыхательного фактора NRF-2, которые участвуют в регуляции биогенеза митохондрий [146]. Бактериальный липополисахарид, вызывающий в клетках млекопитающих повреждение мтДНК с нарушением окислительного фосфорилирования, способен также активировать репликацию мтДНК, экспрессию ядерных дыхательных факторов NRF-1 и NRF-2, а также TFAM ДНК-Pol γ , белка mtSSB [146, 244].

Активация биогенеза митохондрий и синтеза мтДНК в клетках наблюдается на уровне целого организма при воздействии окислителей или ИР. Так, активация репликации мтДНК была выявлена в гиппокампе крыс после введения в мозг этих животных перекиси водорода [245]. В экспериментах на грызунах было показано, что после воздействия ИР в клетках тканей этих животных наблюдается резкая активация биогенеза митохондрий и увеличение числа копий мтДНК [21, 23, 145,

147, 246]. Прямые данные по радиационной индукции репликации мтДНК в тканях мышей были продемонстрированы путем анализа (метод ПЦР) изменения генов мтДНК относительно генов яДНК. В клетках тканей головного мозга и селезенки мышей, подвергшихся воздействию γ -излучения, наблюдалось повышение количества мтДНК (оценка относительно ядерных генов) в течение 70–90 ч, прошедших после облучения [21, 145, 246]. Индукция биогенеза митохондрий и синтеза мтДНК при радиационных воздействиях на клетки сопряжена также с активацией транскрипции и экспрессии митохондриальных генов. Выявлен повышенный уровень экспрессии многих мРНК в клетках глиобластомы человека через 1 ч и на протяжении суток после радиационного воздействия [247]. В другой работе, на срезах мозга мышей показано, что накопление повреждений в мтДНК сопряжено с усилением экспрессии митохондриальных генов, кодирующих белки комплексов (I, III, IV, V) дыхательной цепи [248]. Результаты, полученные в исследованиях на уровне целого организма, также показывают существенные изменения экспрессии генов мтДНК. Так, в клетках тканей мышей, подвергшихся воздействию радиации в летальных и сублетальных дозах, сначала выявляется снижение транскрипции ряда генов мтДНК, а в последующие пострadiационные сроки наблюдается увеличение количества транскриптов этих же генов [249, 250].

Таким образом, рассмотренные данные указывают, что активация биогенеза митохондрий и синтез мтДНК сопряжены с повышенной генерацией АФК и увеличением количества мутантных копий мтДНК в облученных клетках – это есть ответ клетки на сохранение и стабилизацию митохондриальных функций. Если репарационные системы способствуют стабилизации ядерного генома и снижению частоты мутаций в его генах, то значительный вклад в сохранение функционально активных митохондрий и мтДНК вносит индукция амплификации новых копий мтДНК и биогенез этих органелл [148, 149].

Активация дополнительного синтеза мтДНК выявляется не только при остром воздействии повреждающих агентов на клетки, но и при накоплении мутаций и

делений в мтДНК в процессе старения организма. Показано, что количество копий мтДНК в тканях стареющих грызунов повышено по сравнению с таковым показателем у молодых животных [251-253]. Однако синтез новых копий мтДНК на нерепарированных или поврежденных матрицах может увеличивать пул мутантных молекул мтДНК. Более того, ДНК-Pol γ подвергается изменениям в результате окислительных повреждений и склонна включать во вновь синтезируемую мтДНК больше ошибочных нуклеотидов [254].

Митохондриальная динамика. В последние годы значительное развитие получили исследования процессов митохондриальной динамики и их связи с морфологией и функциональной активностью митохондрий [255, 256]. Установлено, что митохондрии являются весьма динамичными органеллами, которые непрерывно изменяют свою форму путем слияния, деления и движения по всей клетке, и эта динамика имеет важнейшее значение для жизни клетки. Митохондрии, в ответ на внутри_ и внеклеточные сигналы, могут формировать ретикулярные сети, находиться в клетках в виде нитчатых структур – “состояние цепи” или в виде отдельных органелл – “индивидуальное состояние”. Различные морфологические вариации митохондрий можно регистрировать в зависимости от типа клеток и их функционирования [257, 258].

Показано, что митохондрии могут перемещаться не только внутри одной клетки, но между клетками. Эти процессы позволяют митохондриям обмениваться содержимым внутри органелл, в том числе – молекулами мтДНК [259-261]. Митохондриальная динамика оказывает влияние на сегрегацию и перенос мтДНК в клетки во время их митоза, и в ряде исследований показано, что существует взаимосвязь между митохондриальной динамикой и стабильностью генома [256, 262].

Механизмы, определяющие баланс слияния/деления митохондрий, не до конца понятны. Однако такое равновесие между делением и слиянием оказывает существенное влияние на функции этих органелл. В недавних исследованиях

показано, что несколько белков семейства гуанозинтрифосфатаз были определены в качестве ключевых молекулярных факторов митохондриального деления и слияния. Эти белки, механохимического действия, локализуются на внешних и внутренних мембранах митохондрий, создают динамичные молекулярные мосты между органеллами. Наиболее изученными из них являются два динамин-связывающих белка (Dnm1/Drp1), белки митохондриального деления (Fis1, MFF) и белки, регулирующие слияния (Mfn1, Mfn2 и Opa1) [263, 264]. Эти белки в процессе регуляции митохондриальной динамики могут подвергаться различным модификациям (включая фосфорилирование, убиквитинирование и сумоилирование) в зависимости от клеточных сигналов, окружающей среды и энергетических потребностей клетки [265]. Мутации или потеря белков, регулирующих динамику митохондрий, приводят к резким изменениям морфологии этих органелл, потере целостности мтДНК, повышению окислительного стресса и клеточной гибели [256, 258].

В настоящее время установлено, что нарушение митохондриальной динамики или наличие дефектов по белкам, участвующим в ее регуляции, ассоциируется с развитием различных патологий, включая нейродегенеративные заболевания, в том числе болезни Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона [266, 267]. Получены результаты, указывающие, что митохондриальный биогенез и митохондриальная динамика взаимосвязаны и оба процесса содействуют индукции адаптивного ответа при нарушениях дыхательной цепи в митохондриях и предотвращению митохондриальной дисфункции [268].

Таким образом, митохондриальная динамика способствует поддержке функционально активной популяции этих органелл в клетках. Более того, поскольку усиление окислительного стресса (увеличение количества АФК и снижение антиоксидантной защиты) приводит к дисфункциям митохондрий, митохондриальная динамика проявляет себя как один из важнейших процессов регуляции окислительно-восстановительного статуса, целостности мтДНК и

сохранения функций этих органелл. В основе этого процесса лежит обмен между компонентами поврежденных и функционально активных митохондрий [257, 258, 266, 268]. Взаимодействие между органеллами с нарушенными и нормальными функциями инициируют слияние и перемешивание метаболитов, ферментов и мтДНК. Митохондрии, подвергшиеся повреждениям, посредством обмена содержимым с нормальными органеллами, могут частично компенсировать аберрантные белки, мутантные копии мтДНК, тем самым снизить уровень гетероплазии и способствовать восстановлению своих функций. Поэтому можно утверждать, что митохондриальная динамика является одним из механизмов снижения или предотвращения митохондриальной дисфункции и поддержания клеточного энергетического гомеостаза [269].

Нарушение митохондриальной динамики, обусловленное дефектами белков, регулирующих слияние/деление, приводит к сохранению окислительного стресса и дисфункциям митохондрий [270]. Недавно было показано, что в фибробластах человека, подвергшихся воздействию ИР, генерация $O^{\bullet}_2$ усиливалась, достигая максимума на 3-и сут после облучения, что сопровождалось ускоренным делением митохондрий. Этому способствовало накопление в этих органеллах динамин-связывающего белка 1 (Drp1). Блокировка экспрессии белка Drp1 предотвращало радиационно-индуцированное ускорение митохондриального деления. Наблюдаемая активация митохондриального деления задерживала развитие митохондриальной дисфункции в облученных клетках [271]. Эти результаты указывают на то, что активация динамики митохондрий способствует сохранению их функции в клетках, подвергшихся воздействию ИР.

Митофагия. Другим важнейшим процессом, связанным с сохранением и стабилизацией функционально активных митохондрий в клетках, подвергшихся радиационному воздействию, можно рассматривать митофагию (удаление нефункциональных митохондрий посредством механизма аутофагии) [258, 272]. Известно, что аутофагия – один из основных механизмов, содействующих

выживанию клеток в условиях стресса и недостаточного питания. Аутофагическая деградация содержимого клеток инициируется при голодании и стрессовых ситуациях для получения недостающих питательных компонентов (аминокислот, углеводов) с целью поддержания метаболизма и выживания клеток [272]. В начальной стадии аутофагии часть цитоплазматических структур и органелл может быть погружена в аутофагосомы – пузырьки с двойной мембраной и доставлена в лизосомальные вакуоли. Аутофагическая доставка митохондрий, имеющих структурно-функциональные нарушения, в лизосомы является важнейшим шагом обеспечения деструкции этих органелл [200-202]. Развитие процесса аутофагии включает не только переработку внутриклеточных компонентов, но и выборочное удаление митохондрий для регулирования их численности и поддержания контроля их качества [273].

В процессе аутофагии морфологически измененные митохондрии (несущие структурно-функциональные нарушения) дают сигналы “согласия на ликвидацию”, т.е. ответ на реакцию триггеров митофагии. В результате такие органеллы могут быть охвачены аутофагосомами. Таким образом, морфологические изменения архитектуры митохондрий определяют запуск митофагии, что указывает на взаимосвязь между морфологией органелл и внутриклеточными сигналами запуска этой клеточной реакции [274, 275].

Повышенное производство АФК в митохондриях может служить также сигналом для запуска аутофагии с селективной элиминацией органелл с нарушенными функциями. Возможно, это способствует удалению митохондрий, имеющих структурно-функциональные нарушения и приводящие к изменению энергетического гомеостаза в клетках, подвергшихся радиационному воздействию.

Нарушение процесса аутофагии сопровождается накоплением в клетках поврежденных митохондрий. Поэтому митофагию можно рассматривать как важнейший механизм поддержки качества митохондриальной популяции в клетках [274, 276]. Хотя аутофагию, в основном, принято рассматривать как защитный

механизм, который поддерживает выживаемость клеток в неблагоприятных условиях и условиях голодания, излишняя активность этого процесса может привести к гибели клеток (так называемый II-тип гибели клеток) [273, 277]. Следует отметить, что на развитие клеточной аутофагии могут также оказывать влияние сами митохондрии. Так, при запуске аутофагической деградации содержимого клетки наблюдается удлинение и укрупнение митохондрий. Удлинение митохондрий (с увеличением их крист) способствует оптимизации в них производства АТФ и задержке активного развития аутофагии клеток в условиях снижения питательных веществ [278, 279]. Вместе с тем, остается много неясного в понимании механизмов развития процесса аутофагии и сигнальных путей, контролирующих митофагию.

Имеющиеся данные для понимания митофагии получены, главным образом, в исследованиях на дрожжах. Так, на клетках *Saccharomyces cerevisiae* показано участие протеинкиназ в митофагии (двух митоген-активируемых протеинкиназ – MAPK, Slt2 и Hog1). Эти протеинкиназы необходимы для запуска митофагии. Также они оказывают влияние на “загрузку” митохондрий в аутофагосомы, чтобы обеспечить их селективную деградацию [280]. Ряд специфических белков, как было недавно показано, оказывает влияние на регуляцию митохондриальной динамики и на митофагию в клетках высших эукариот. В частности, белки LC3B, ATG5 и ATG12 участвуют в контроле процесса митофагии [281].

АТФ-зависимые протеолитические ферменты, локализованные в самих митохондриях, также могут внести существенный вклад в деградацию поврежденных митохондрий. Это семейство протеаз подразделяется на несколько подсемейств: Lon-протеазы (LonA и LonB), CLP-протеазы и AAA-протеазы [282, 283]. Митохондриальные протеазы также способствуют стабильности мтДНК, оказывая влияние на ее упаковку в составе нуклеоида, на процессы репликации, транскрипции и трансляции. Lon-протеазы являются основными протеазами митохондриального матрикса и участвуют в деградации белков, модифицированных в результате окислительного стресса. Lon-протеазы вовлечены также в регуляцию

уровня TFAM и количества копий мтДНК. Так, снижение уровня TFAM и числа копий мтДНК наблюдается при гиперэкспрессии Lon-протеазы в клетках. Lon-протеаза регулирует митохондриальную транскрипцию, стабилизируя соотношение TFAM и мтДНК посредством избирательной деградации TFAM [283]. Недавно показано, что AAA-протеазы также участвуют в процессе биогенеза митохондрий и способствуют избирательному расщеплению белков, имеющих нарушенную геометрию укладки. Функции AAA-протеаз и CLP-протеаз еще недостаточно выяснены, однако некоторые данные указывают, что они вносят вклад в общий контроль качества митохондрий [284, 285].

Избирательное удаление из клеток поврежденных митохондрий, посредством механизма митофагии, недавно было продемонстрировано в гепатоцитах трансгенных мышей, подвергшихся световому воздействию при 488 нм [66]. Для этого зеленый флуоресцирующий белок, экспрессируемый этими клетками и локализуемый в митохондриях, был использован в качестве маркера формирования аутофагосом. Повреждение клеток приводило к формированию аутофагосом с деполяризацией митохондрий и с последующим выходом из них флуоресцентного белка, в зависимости от дозы облучения этих клеток [66]. Селективная деградация митохондрий, имеющих функциональные нарушения, была показана в фибробластах больных, несущих мутации в мтДНК [286]. Это указывает, что аутофагия (с включением митофагии) контролирует качество популяции митохондрий путем селективного удаления из клеток органелл со структурно-функциональными нарушениями. Поэтому митофагию можно рассматривать как клеточную реакцию, направленную на ликвидацию поврежденных митохондрий и соответственно на уменьшение окислительного стресса, создаваемого в результате нарушений в ЦПЭ в митохондриях клеток, подвергшихся радиационному воздействию.

Также следует заметить, что с возрастом организма постоянное обновление митохондрий посредством включения систем биогенеза, динамики и митофагии имеет решающее значение для поддержания здоровых органелл в клетках тканей.

Развитие митофагии особенно важно для стареющих клеток постмитотических тканей (сердца, мозга), в которых может накапливаться повышенное количество поврежденных митохондрий [287]. Снижение этих процессов биогенеза, как полагают, способствует старению и развитию различных патологий, в том числе нейродегенеративных заболеваний [288].

Таким образом, можно полагать, что, хотя мтДНК характеризуется повышенной частотой повреждений и недостаточно эффективной их репарабельностью, сохранению митохондриального генома и поддержке функционально активных митохондрий в облученных клетках способствуют следующие факторы: наличие в клетках множества копий мтДНК, ассоциированных с белками; индукция антиоксидантной системы; биогенез митохондрий с синтезом мтДНК; активация митохондриальной динамики и митофагии.

1.2. Внеклеточная ДНК как потенциальный биомаркер оценки лучевой реакции организма

В последние годы активно ведутся исследования по выявлению молекулярных биомаркеров в биологических жидкостях, для неинвазивной диагностики различных патологий. Существует обширная литература, в которой показано, что количественные и структурные изменения циркулирующей внеклеточной ДНК (вк-ДНК) в плазме/сыворотке и моче можно рассматривать в качестве прогностического и диагностического биомаркера при различных патологиях человека [432]. Количественные и качественные характеристики вк-ДНК в биологических жидкостях чаще всего рассматривают при диагностике и оценке раковых заболеваний, а также в пренатальной диагностике [289-298].

Хорошо известно, что определенное количество вк-ДНК всегда можно регистрировать в плазме и сыворотке здорового человека. В литературных источниках описано участие вк-ДНК во многих процессах. Известно, что вк-ДНК в клетках животных и человека принимает участие в регуляции клеточного цикла, активирует транскрипционные факторы и сигнальные пути, является активатором иммунной системы с участием рецепторных белков TLR9 [428-430]. Показана роль вк-ДНК как фактора стресс-сигнализации в радиационно-индуцированном эффекте–свидетеля [431].

Источником вк-ДНК в биологических жидкостях могут являться как нормальные клетки тканей, так и клетки плода и плаценты беременных женщин, клетки трансплантированных органов и тканей. В составе циркулирующих нуклеиновых кислот в биологических жидкостях могут быть также опухолевые клетки и ДНК возбудителей инфекционных заболеваний. Тем не менее основной причиной появления циркулирующих нуклеиновых кислот в биологических жидкостях является клеточная гибель (апоптоз, некроз, аутофагия). Считается, что циркулирующая ДНК в биологических жидкостях (плазма, моча, слюна) имеет длину от 200 до 600 п.н., хотя встречаются и более крупные молекулы. Тем не менее, основным источников циркулирующей ДНК в биологических жидкостях принято считать постоянная клеточная гибель, по механизму апоптоза. Известно, что в продукты апоптической деградации в биологических жидкостях встречаются в большей мере [290, 296, 299]. Циркулирующие фрагменты яДНК и мтДНК в биологических жидкостях подвержены нуклеазному расщеплению, однако часть их, в зависимости от структуры и упаковки в составе белков, может сохраняться в течение длительного времени. Как известно из литературы большая часть циркулирующей ДНК в биологических жидкостях представлена в составе нуклеосом, липопротеидов, апоптических везикул [290, 296, 297, 300].

Повышенные уровни циркулирующей ДНК в сыворотке крови у онкологических пациентов, по сравнению со здоровыми индивидуумами, впервые

были обнаружены 40 лет назад [301]. Подтверждение этих наблюдений было также показано в дальнейших исследованиях [292, 293, 297, 302, 303]. Результаты исследований циркулирующей ДНК в плазме крови у больных с легочными заболеваниями показали, что уровень циркулирующей ДНК повышен у 71% больных раком легких, однако у 29% пациентов с положительной динамикой не были обнаружены количественные изменения данных параметров [302, 303].

Изменение содержания нуклеосом в плазме или сыворотке могло бы служить апоптическим маркером для оценки гибели нормальных и опухолевых клеток у пациентов [296, 304]. Повышенный уровень вк-ДНК наблюдается не только в плазме/сыворотке пациентов с неоплазией, но и у пациентов с предраковыми состояниями, с воспалительными процессами, при геморрагическом и ишемическом инсульте, при травмах и инфаркте миокарда и др. [291, 305, 306]. Повышается уровень вк-ДНК в плазме пациентов, которым проведена трансплантация органов и при осложнениях беременности [298, 302, 305, 307].

Для мтДНК в клетках тканей, как было отмечено, характерна повышенная нестабильность и частота мутаций в ней, которые связаны с высокой её повреждаемостью и низкой эффективностью систем репарации в митохондриях. Во многих типах опухолей наблюдаются соматические мутации в мтДНК с повышенной частотой. Больше всего мутаций обнаруживается в гипервариабельном участке D-петли мтДНК [308-312].

Большой интерес представляют также исследования количественного содержания вк-мтДНК в плазме онкологических больных [312-314]. Обнаружение повышенного содержания вк-мтДНК в плазме, а также вк-мтДНК с повышенным содержанием мутаций рассматривается как специфический вспомогательный маркер для диагностики и оценки прогноза онкологических пациентов [315, 316].

Однако, с позиции цели и задач выполняемого нами исследования, нам важно было ознакомиться результатами исследований по изменению содержания мтДНК и

ее мутантных копий в плазме онкологических пациентов при проведении радио-химиотерапии.

Сведения об изменении количества или качественного состава циркулирующей вк-ДНК (вк-мтДНК) в биологических жидкостях животных или человека, подвергшихся радиационному воздействию весьма ограничены. Так, в работе Владимирова В.Г. и его коллег впервые экспериментально было показано, что в крови облученных крыс возрастает содержание общей вк-ДНК пропорционально дозе гамма-излучения [317]. В недавнем сообщении [318], появившимся после наших публикаций, также представлены данные, указывающие на увеличение яДНК в плазме мышей, облученных в диапазоне доз 2-10 Гр.

Большинство исследований по оценке содержания циркулирующей вк-ДНК проводится различными вариантами метода количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Значительное количество данных, полученных этим методом, показывает, что он может быть использован для определения изменений уровня вк-ДНК в плазме (сыворотке) пациентов и мониторинга оценки эффективности терапии опухолей [319, 320]. В ряде исследований были получены результаты изменения общей вк-ДНК в плазме пациентов после проведения химиотерапии [321, 322] и радио-химиотерапии [304, 320]. После проведения терапии опухолей с удовлетворительными результатами наблюдается снижение концентрации вк-ДНК в плазме этих пациентов, а в отсутствии положительной реакции от терапевтических процедур у больных содержание вк-ДНК в их плазме не снижалось [321, 322]. Анализ уровня нуклеосом в плазме пациентов при радио-химиотерапии рака легкого показал, что их содержание снижается после достижения существенных результатов терапии [322]. Аналогичные данные получены и при анализе нуклеосом в сыворотке у пациентов с раком поджелудочной железы до, и после проведения радио-химиотерапии [304]. Если режим химиотерапии был эффективен, то значительное количество опухолевых клеток гибнет в течение 24-72 часов, и концентрация опухолеспецифичных вк-ДНК, возрастало в плазме в этот период, а в последующий

посттерапевтический период – снижалась. Увеличение содержания общей вк-ДНК наблюдали в плазме пациентов при проведении радиотерапии опухолей [323]. А через определенные сроки после завершения радиотерапии с положительными результатами у пациентов наблюдали снижение вк-ДНК [324].

Таким образом, можно утверждать, что уровень общей вк-ДНК существенно отличается у онкологических пациентов в плазме до, и после радио-химиотерапии.

Циркулирующие фрагменты вк-мтДНК и вк-яДНК, поступающие в кровоток у животных, возможно, подвергаются нуклеазной деградации, но определенная ее часть, защищенная от действия нуклеаз, может оказаться в моче как трансренальная ДНК [290]. Моча является традиционно широко используемым материалом, который содержит огромное разнообразие продуктов метаболизма, чрезвычайно удобным для поиска специфических биомаркеров для диагностики различных патологий [325]. Исследования вк-мтДНК и вк-яДНК в моче для прогностической и диагностической оценки патологии имеют очевидные преимущества относительно исследований с использованием плазмы/сыворотки крови [290, 326]. В настоящее время качественные и количественные изменения яДНК в моче регистрируются у онкологических больных. Так, известно об обнаружении измененной мтДНК в моче пациентов с уротелиальной карциномой [327]. ДНК в моче беременных женщин позволяет определять пол ребенка и диагностировать наличие патологии [328].

Чрезвычайно важная задача данного исследования заключалась в том, чтобы тщательно рассмотреть и изучить копии мутаций молекул мтДНК, а также их общее количество, по сравнению с молекулами яДНК. На основании этого необходимо было исследовать трансформационные преобразования в тканях грызунов, подвергшихся радиационному воздействию, вк-мтДНК в плазме крови и моче до момента радиационного воздействия и после этого момента.

Поскольку в литературе данные об изменении количественных и качественных характеристик циркулирующих внеклеточных ДНК в биологических жидкостях

человека и животных, подвергнутых радиационному воздействию противоречивы и скудны, часть своих экспериментальных исследований мы посвятили анализу вк-яДНК и вк-мтДНК в плазме и моче облученных животных, с целью использования их для разработки чувствительных биомаркеров радиационного поражения [329].

1.3. Влияние радиопротекторов на функционирование митохондрий и целостность мтДНК в облученных клетках

За последнее 25 лет произошел серьезный сдвиг в радиобиологической парадигме. Возникновение двунитевых разрывов яДНК и митохондриальной дисфункции, с повышением окислительного стресса, сегодня рассматривается как два критических события, приводящих к гибели клеток или к развитию отдаленных последствий в виде онкогенеза, нейродегенеративных заболеваний и других патологий человека. Если в процессе радиотерапии для подавления опухолевого роста требуется ингибирование репарации двунитевых разрывов яДНК, то для снижения лучевых нагрузок на нормальные ткани необходимо обеспечить защиту и подавление митохондриальных дисфункций [433].

Исследования, начатые 25 лет назад, показали, что при облучении клеток микропучками ионизирующих излучений наблюдалась индукция сестринских хроматидных обменов не только в клетках-мишенях, но и в клетках, находящихся вблизи и не подвергавшихся воздействию радиации. В прилежащих клетках также были установлены генные мутации, появление микроядер, ДР яДНК, активация экспрессии генов, нестабильность генома в нескольких поколениях клеток и их дальнейшая канцерогенная трансформация. Феномен индукции генотоксических эффектов в клетках, находящихся рядом с клетками-мишенями, подвергавшихся облучению, получило название «эффекта свидетеля» [330, 433]. Эффект свидетеля

наблюдается не только при облучении клеток целиком, но даже и при облучении микропучком только цитоплазмы (не затрагивая ядро). Важнейшими мишенями радиационного повреждения в цитоплазме становятся именно митохондрии. Это подтверждается многими исследованиями. Так, эффект свидетеля затормаживается в нормальных клетках при введении в среду их инкубации ингибиторов митохондриальных функций. Частота мутаций яДНК, при облучении цитоплазмы клеток микропучком альфа-частиц, значительно выше, чем частота мутаций, выявляемых при облучении ядер тех же клеток. Облучение цитоплазмы клеток дикого типа (ρ^+ клетках) ИИ с высокими ЛПЭ индуцировало образование двунитевых разрывов и окислительные повреждения яДНК, тогда как в клетках (ρ^0 клетках), лишенных мтДНК, этих повреждений яДНК не было – в них не функционировали процессы окислительного фосфорилирования и генерации активных форм кислорода и азота (АФК/А) [331, 433]. Развитие исследований по данному направлению, возможно, также позволит понять механизмы абскопальных эффектов, возникающих в процессе радиотерапии опухолей.

Радиационное повреждение мтДНК, отсутствие ее эффективной репарации и нарушение функций митохондрий с повышенной генерацией АФК/А оказывают влияние на пострadiационное развитие целого комплекса эффектов на уровне клеток и всего организма млекопитающих. Нарушаются биоэнергетические, биосинтетические и сигнальные процессы в митохондриях. Изменение экспрессии мутантных генов мтДНК с синтезом дефектных белков, кодируемых ими, приводит к пертурбации системы цепи переноса электронов и синтеза АТФ. Это приводит к «перепроизводству» АФК/А, к усилению окислительного стресса, который способствует дальнейшему повреждению мтДНК и дисфункции митохондрий – таким образом формируются «порочные круги» на длительный пострadiационный период [332, 333, 433, 434]. Возникновение хронического повышенного окислительного стресса, обусловленного АФК/А, является важнейшим индуктором нестабильности генома. В клетках тканей человека НСГ может иметь

катастрофические последствия для развития многостадийного механизма радиационного канцерогенеза, а также является фактором многих нейродегенеративных и других патологий. НСГ, регистрируемая в клетках тканей пациентов после радиотерапии опухолей, рассматривается как важная стадия развития отдаленных последствий радиационного воздействия [334, 433, 434].

Традиционно, для снижения АФК/А, используются антиоксиданты. В литературе представлено большое количество таких соединений, способных снижать повреждения клеток и многоклеточных организмов. Тем не менее, лицензии для их клинического применения получены только на несколько препаратов. Поскольку, основным внутриклеточным источником АФК/А (90%) являются митохондрии, препараты указанных классов имеют ограниченный доступ в эти органеллы, для подавления повышенного уровня окислительного стресса в облученных клетках. Многие соединения не способны преодолевать барьер внутренней митохондриальной мембраны.

Амифостин, наиболее эффективный радиопротектор, созданный по программе радиозащитных средств армии США (один из 4400 соединений), является препаратом, рекомендованным к клиническому применению. Исключительность амифостина заключается в том, что после отщепления от него фосфатной группы (щелочной фосфатазой мембраны) он приобретает способность переходить в митохондрии.

В последнее время разработан новый подход снижения радиационных повреждений, основанный на использовании митохондриально направленных антиоксидантов. Созданы десятки препаратов, которые проявляют повышенные радиопротекторные и радиомитигаторные свойства. Радиопротекторы, которые ранее считались недостаточно эффективными, при их конъюгации с трифенилфосфонием (ТФФ) способны преодолевать мембранный барьер - проникать в митохондрии и подавлять повышенный окислительный стресс [335, 433].

Наряду с этим, имеются соединения, способные преодолевать мембранный барьер митохондрий и без привязки к ТФФ. К таким соединениям относятся мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин «гормон сна») и метформин (N, N'-диметилбигуанидин [434].

Мелатонин представляет значительный интерес как антиоксидант, снижающий эффекты воздействия различных токсических факторов, включая воздействия ИИ [434]. Мелатонин является древним антиоксидантом, который является защитником ДНК от окисления. Мелатонин цианобактерий, которые существовали на Земле миллиарды лет тому назад, содержится и в клетках человека. Согласно эндосимбиотической теории (происхождения митохондрий), древние бактерии превратились в митохондрии эукариот. Они сохранили способность синтезировать мелатонин. Таким образом, мелатонин не только поглощается митохондриями, но и продуцируется этими органеллами. Мелатонин можно рассматривать как природный, митохондриально нацеленный, мощный антиоксидант. У позвоночных мелатонин является основным продуктом эпифиза, что объясняет его увеличение в сыворотке крови во время темной фазы суток, но также он вырабатывается многими другими органами и типами клеток. Мелатонин содержится в одноклеточных организмах, грибах, растениях и во всех клетках животных и человека [434].

Согласно нашим наблюдениям, введение мелатонина мышам, за 30 мин до их облучения и через 20 мин после облучения летальными дозами рентгеновских лучей, оказывает достаточно выраженные эффекты повышения их выживаемости [435]. Мелатонин способен защищать ДНК и другие клеточные макромолекулы от возникновения повреждений, вызываемых эндогенными АФК/А, активирует экспрессию антиоксидантных ферментов и стимулирует активность репарационных систем. Мелатонин снижает окислительный стресс и воспалительные процессы во всех тканях млекопитающих и оказывает антиканцерогенное, геропротекторное, нейропротекторное и иммуномодулирующее действие [336,337, 434, 435].

В ряде клинических публикаций указывается, что введение мелатонина пациентам, отдельно или в сочетании с традиционной лучевой терапией, приводит к благоприятным эффектам и снижению токсичности при лечении различных видов рака [338,339, 434, 435]. В этих работах рассматривается возможность использования мелатонина в качестве радиопротектора для защиты и нормальных тканей в процессе радиотерапии опухолей. Установлена способность мелатонина подавлять пролиферацию различных раковых клеток и модулировать экспрессию мембранных рецепторов в этих клетках, тем самым, снижая агрессивность опухоли к метастазированию [340].

Использование мелатонина в процессе радиотерапии оказывает выраженное антиангиогенное действие посредством снижения экспрессии генов, вовлеченных в развитие ангиогенеза. Результаты многих исследований также показывают, что мелатонин является полезным препаратом для использования в качестве адъюванта при лучевой терапии опухолей.

Однако в настоящее время проведены только ограниченные исследования по выявлению защитного действия мелатонина на нормальные ткани, при проведении радиотерапии опухолей с использованием ИИ с высокой ЛПЭ.

Таким образом, мощный радиозащитный эффект мелатонина, низкая токсичность, способность подавлять митохондриальную дисфункцию, способность проникать в митохондрии различных типов клеток - является важной характеристикой данного соединения для его использования в качестве средства, снижающего радиационно-индуцируемые повреждения, в том числе в нормальных близлежащих тканей при проведении радиотерапии опухолей.

Поэтому в настоящей работе были проведены исследования влияния мелатонина на ряд маркеров повреждений в тканях мышей при введении его до и после облучения.

Гибель клеток со структурно-функциональными нарушениями в тканях животных и человека представляет собой активный процесс, поддерживающий

обновление клеточных популяций, функциональную целостность и гомеостаз тканей. Наличие циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях животных и человека принято рассматривать как результат постоянно реализуемой клеточной гибели в их тканях. Ряд исследований показывает, что количественные или структурные изменения внеклеточной ДНК (вк-ДНК) в составе “жидкой биопсии” можно рассматривать как биомаркеры для диагностической и прогностической оценки различных патологий, и больше всего при диагностике и в процессе терапии опухолей [341, 342].

Различные модуляторы клеточной гибели также позволяют оценивать их действия по изменению содержания вк-ДНК в биологических жидкостях животных и человека. Таким модуляторам относится N, N'-диметилбигуанидин [метформин (МФ)], который является пероральным гипогликемическим агентом, широко используемым в терапии сахарного диабета 2-типа [343]. Хотя молекулярные механизмы действия МФ остаются непонятными [343], известно, что это лекарство снижает частоту возникновения онкогенеза у людей, и увеличивает продолжительность жизни у грызунов [344]. МФ также способствует повышению эффективности радиотерапии опухолей при его комбинированном применении [345, 346].

В исследовании Миллера и соавторов, которые показали, что при введении МФ мышам после их облучения происходит повышение выживаемости клеток селезенки в эндогенных колониях [347]. Недавно также показано, что метформин снижает индуцированный радиацией легочный фиброз у мышей [348].

В ряде исследований показано, что при воздействии ионизирующих излучений на клетки эукариот *in vitro* и *in vivo* в митохондриях, в результате нарушения системы цепи переноса электронов, происходит отсроченная пострadiaционная повышенная генерация активных форм кислорода (АФК), которые вызывают повреждения ядерного генома [349, 350]. Повышенную генерацию АФК в митохондриях облученных клеток можно наблюдать в течение длительного времени.

Эти данные предполагают, что воздействие радиации вызывает митохондриальную дисфункцию, которая приводит к пролонгированному производству АФК и снижению синтеза АТФ [332]. Таким образом, поврежденные митохондрии становятся индукторами окислительного стресса, сохраняющегося после облучения клеток. Ранее было показано, что МФ способен блокировать активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий, который является одним из источников генерации АФК [351, 352]. Известно, что МФ может накапливаться в митохондриях млекопитающих и влиять на окислительное фосфорилирование [353, 354].

С другой стороны, установлено, что метформин инициирует активность антиоксидантного фермента пероксиредоксина - PRDX-2 посредством сигналов митогормезиса [355]. Снижение генерации АФК, вызываемое МФ, сопровождается также снижением повреждений ДНК, включая накопление двунитевых разрывов ДНК и мутаций [356, 357].

Таким образом, МФ в клетках организма животных, облученных ионизирующей радиацией, действует аналогично митохондриально-направленным соединениям, подавляющим пострadiационную генерацию АФК, и способствующим снижению повреждений ядерного генома и повышению выживаемости клеток или животных.

На сегодняшний день известно, что МФ не только блокирует повышенную генерацию АФК в поврежденных митохондриях, но и способствует активации АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) [358, 359, 360]. Важнейшей причиной активация АМФК в облученных клетках может являться увеличение содержания АМФ и уменьшение пула молекул АТФ в результате ее расхода и нарушения ее синтеза в митохондриях клеток облученных животных [360, 361]. Известно, что МФ активируя АМФК, стимулирует биогенез митохондрий посредством ко-активаторов PGC-1 α [361, 362], сопровождаемый удалением посредством митофагии поврежденных или нефункциональных органелл, для восстановления здоровой популяции митохондрий в клетках [363, 364].

МФ, возможно, активирует удаление из тканей большего количества поврежденных клеточных образований, потенциальными для развития патологического нарушения [365]. Недавно был рассмотрен и идентифицирован новый класс препаратов, названный *senolytics*, которые избирательно удаляют из тканей поврежденные или стареющие клетки [366]. Возможно, МФ также способствует удалению, скорее всего, по механизму аутофагии клеток из тканей облученных животных в пострадиационный период, с которым связано повышение вк-ДНК в моче этих животных. Препараты, направленные на эти же факторы, выборочно вызывают гибель стареющих клеток [367].

Поскольку наличие циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях животных и человека принято рассматривать как результат постоянно реализуемой клеточной гибели в их тканях, в настоящей работе мы исследовали влияния МФ на экскрецию внеклеточной ядерной ДНК (вк-яДНК) и внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) с мочой крыс, облученных рентгеновскими лучами, а также на выживаемость мышей и частоту образования МЯ в клетках их костного мозга.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Лабораторные животные

В работе использовались самцы мышей линии BALB/c 2-х месячного возраста (масса тела 30 г), а также самцы крыс линии Fisher-344 3-месячного возраста (масса тела 150 г), полученных из питомника филиала Института биоорганической химии РАН (Пущино, Московская обл.). Подопытные самцы грызунов проживали в нормальной, лабораторной среде с достаточным микроклиматом, в помещении с нормальным освещением. Питание животным было обеспечено в необходимом количестве, в свободном доступе. После того, как животные были подвергнуты эвтаназии, у них были взяты образцы тканей различных внутренних органов: головного и костного мозга, селезенки, а также плазма крови. У отдельных крыс проводили сбор мочи – до процедуры облучения и после. Все проведенные опыты были реализованы по нормативам распорядительного акта ЕСС Directive 2010/63/EU.

2.2. Облучение

Животных подвергали общему воздействию рентгеновского излучения в дозах 3, 5 и 8 Гр, группами по 5 животных в пластиковых контейнерах (мощность дозы 1 Гр/мин) на рентгеновской установке “РТУ-12” (“Медрентген”, Россия) при напряжении 200 кВ и силе тока 18 мА, с фильтрами 1 мм Al и 1 мм Cu. Краниальное облучение крыс проводили в дозах 3 и 5 Гр (протоны, E = 150 МэВ) на установке “Фазотрон” Медико-технического комплекса Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ (Дубна).

2.3. Приготовление и условия введения препаратов животным

Для растворения мелатонина (“Sigma-Aldrich”, США) использовалась кипяченая вода, остывшая до комнатной температуры. В воду добавлялся 0,1% диметилсульфоксида (ДМСО). В итоге получалась жидкость, в которой присутствовал мелатонин в 2,5% и 0,1% ДМСО. Раствор вводили мышам перорально в объеме 100 мкл, что соответствует дозам МЕЛ 125 мг/кг и ДМСО 0,1 мг/кг массы тела мыши [368]. Параллельно готовился состав с 0.1% ДМСО в целях применения в группе контроля эксперимента. Обе группы, участвующие в опыте, насчитывали по пять особей животных. Состав вливали в питьевую воду в течение 24 и 48 ч особям, которые уже получили основной объем данного состава через 20 мин после того, как была проведена процедура облучения, с учетом небольшого клиренса МЕЛ [368].

Блеомицин (НПФ «Научпрофи», Москва) вводили подопытным внутрь брюшной полости в объемах, равных 3, 7 и 10 мг/кг.

Метформин (Merck, Darmstadt, Germany) был использован для животных, в расчете по 300 мг/кг массы тела, введение проводилось путем вливания в питьевую воду, которую употребляют мыши. Предложенный объем метформина (МФ) является безопасным, он не вызывает развитие токсичного влияния [369] и применение данного объема средства, в расчете 600 мг/кг массы тела в день на протяжении 9 месяцев не оказывало негативного воздействия на состояние почек [370]. Мышам вводили МФ за 25 мин до и через 15 мин, 6, 24 ч после облучения.

2.4. Пострадиационная выживаемость животных

Контроль над опытной группой особей производился в течение 30 суток, велось наблюдение за выживаемостью после проведения процедуры облучения.

Мониторинг реализовывали ежедневно, в одно и тоже время, все данные фиксировали. Обе группы животных, состояли из 30 подопытных.

2.5. Микроядерный тест

Цитогенетический анализ, по определению уровня образования МЯ в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга мышей проводили, как описано [371]. Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации через 24 ч после облучения. Красный костный мозг бедренной кости вымывали с помощью фетальной сыворотки телят. Суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин. Клетки ресуспендировали в сыворотке и готовили мазки, фиксировали метанолом и окрашивали методом May-Grunwald-Giemsa (Merck, Германия). Для всех подопытных были подготовлены по четыре слайда, в общей сложности были подсчитаны около 2000 ПХЭ. Подсчет ПХЭ с МЯ на слайдах осуществляли с помощью светового микроскопа с использованием иммерсионного масла с объективом x100 при общем увеличении x1000.

2.6. Выделение ДНК

Для экстрагирования ДНК из мозга и селезенки, применяли специальный комплекс QIAGEN Genomic Tip Kit и Genomic DNA Buffer, согласно всем прописанным рекомендациям, которые указаны в документации от компании, выпускающей данные наборы («QIAGEN», Германия).

Сбор материала – крови, проводился в пробирки, в которых присутствовало ЭДТА. Далее пробы помещались в центрифугу, которая начинала работать в течение 10 минут со скоростью оборотов 16 000 x g [372]. Далее материал подвергался

выделению ДНК, для чего использовались магнитные сорбенты [373] с применением комплекса реагентов «Magna™ DNA MegaPrep Plasma» («Лаборатория Изоген», Москва) в полном соответствии с инструкциями от компании – производителя.

Свободную от клеток ДНК из мочи экстрагировали с помощью комплекса реактивов WizardPlus MiniprepsDNA Purification System, согласно всем прописанным рекомендациям, которые указаны в документации от компании, выпускающей данные наборы («Promega», США).

2.7. Определение концентрации ДНК

Для определения концентрационного содержания ДНК в тканях использовали Qubit («Invitrogen», США) и специальные реактивы Qubit™dsDNA AssayKits («Invitrogen», США) согласно всем прописанным рекомендациям, которые указаны в документации от компании, выпускающей данные наборы. Объем общего микса использовался из расчета количества образцов. На один образец выходил 1 мкл красителя и 199 мкл буфера. Далее для измерения каждого образца использовали 190 мкл буфера (содержащий краситель) и 10 мкл ДНК и помещали в прибор для измерения.

2.8. Выделение РНК

Выделение РНК проводили с помощью набора «Trizol RNA Prep 100» («Лаборатория Изоген», Москва). Бралась пробирка, в которую выливали пробы в объеме 100 мкл, далее вводили тризол в количестве 1 мл и полученную жидкость активно смешивали до тех пор, пока не получался однородный раствор. Далее пробирки, в которых была разлита полученная суспензия, отправляли на 5 минут в

холодильник и выдерживали при температуре 4 градуса. Затем в образцы добавляли хлороформ в количестве 200 мкл, активно смешивали ингредиенты и отправляли образцы обратно в холодильник. В данном растворе происходит агрегация белка под воздействием фенола, который присутствует в составе суспензии. Фенол обладает более высокой степенью плотности, чем обычная вода. В том случае, если в воде присутствует достаточно большой объем различных веществ, соли, которые обладают способностью повышать плотность воды, тогда возможно в итоге получить инверсию фазы в течение экстракции, если фенол покрывает собой водную среду. Вода также обладает меньшей плотностью по сравнению с хлороформом. Если вводить последний ингредиент, то он повышает плотность данного состава, что препятствует инверсии стадии. После того, как сосуды с образцами находились в холодильнике в течение 5 минут и при температуре 4 градуса, пробирки ставили в центрифугу с частотой вращения ротора 1400 оборотов в минуту, чтобы отделить слои друг от друга. По окончании работы прибора было видно, что состав делится на фазы, которые образуются по итогам преобразования белка и РНК концентрируются сверху. Получившийся прозрачный состав аккуратно переливали в другой сосуд, чтобы не задевать прочие ингредиенты в пробирке, в которых содержатся протеины и ДНК. Далее, в ходе исследования, происходило концентрирование РНК, для чего добавляли изопропанол в количестве 600 мкл. Сосуды с составами помещали в холодильник с температурой минус 20 градусов и оставляли их на 30 минут. На следующем этапе сосуды помещали в центрифугу, которая работала в течение 15 минут с частотой вращения ротора 14000 оборотов в минуту. В результате процедуры появлялся осадок на дне пробирки, который изымался, а затем подвергался сушке, которая длилась 10 минут. Далее вливали 50 мкл ЭкстраГена Е, ресуспендировали и подвергали нагреву 5 минут при 65°C, вторично вмешивали на вортексе в течение 15-20 секунд.

2.9. Определение концентрации РНК

Для определения концентрационного содержания РНК в тканях использовали Qubit («Invitrogen», США) и специальные реактивы QubitTMRNA AssayKits («Invitrogen», США) согласно всем прописанным рекомендациям, которые указаны в документации от компании, выпускающей данные наборы. Объем общего микса использовался из расчета количества образцов. На один образец выходило 1 мкл красителя и 199 мкл буфера. Далее для измерения каждого образца использовали 190 мкл буфера (содержащий краситель) и 10 мкл РНК и помещали в прибор для измерения.

2.10. Обратная транскрипция для генов мРНК

Два мкг РНК подвергали обратной транскрипции в кДНК с использованием обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя в общем объеме реакции 20 мкл. В отрицательном контроле вводили 5 мкл воды. Суспензию активно смешивали на вортексе, далее сосуды подвергали подогреву в термостате 40 минут при температуре 50°C. Чтобы остановить элемент обратной транскриптазы в сосуды добавляли 10 мкл «Стоп-смеси», затем инкубировали 10 мин при 95°C. Полученные пробы кДНК хранили при -20°C.

2.11. Определение экспрессии генов мРНК методом ПЦР в реальном времени

Анализ экспрессии генов техникой ПЦР в реальном времени проводили на приборе Prism 7500 («Applied Biosystems», США) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR LowROX («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом

производителя. Реакционная смесь содержала 4 мкл кДНК, разбавленной в 20 раз, и 250 нМ каждого праймера. Последовательности праймеров приведены в таблице 2. Анализ кривых плавления был выполнен для всех генов, и специфичность, а также целостность продуктов ПЦР были подтверждены присутствием одного пика. Абсолютные значения экспрессии определяли по стандартной кривой, полученной в виде серии 10-кратных разведений объединенного образца кДНК. Уровни транскрипции генов-мишеней были нормализованы по уровню эталонного гена β -актина. Нормализованные значения экспрессии генов анализировали с использованием программного обеспечения Prism GraphPad 7.0. Экспрессия гена у контрольных животных была принята за 100%.

Таблица 2. Последовательности праймеров и зондов, использованные для амплификации.

Локусы ДНК	Размер п.н.	Праймеры и зонды	5'→3' последовательность
Крысы			
<i>Праймеры для анализа повреждений ДНК (ПЦР-ПФ)</i>			
<i>мтДНК</i>	13,4 kb	for rev	AAAATCCCCGCAAACAATGACCACCC GGCAATTAAGAGTGGGATGGAGCCAA
<i>яДНК</i>	12,5 kb	for rev	AGACGGGTGAGACAGCTGCACCTTTTC CGAGAGCATCAAGTGCAGGCATTAGAG
<i>кор мтДНК</i>	235	for rev	CCTCCCATTCATTATCGCCGCCCTTGC GTCTGGGTCTCCTAGTAGGTCTGGGAA
<i>кор яДНК</i>	195	for rev	GGTGTACTTGAGCAGAGCGCTATAAAT CACTTACCCACGGCAGCTCTCTAC
<i>Праймеры для анализа количества копий мтДНК</i>			
<i>mt-tRNA</i>	73	for rev probe	AATGGTTTCGTTTGTTC AACGATT AGAAACCGACCTGGATTGCTC R6G-AAGTCCTACGTGATCTGAGTT-RHQ1
<i>GAPDH</i>	80	for rev probe	TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC GGCTCTCTCCTTGCTCTCAGTATC FAM-CTGGACCACCCAGCCCAGCAA-RTQ1

<i>Праймеры для анализа мутантных копий мтДНК</i>			
<i>mt-tRNA</i>	507	for rev	CACACTCTCACTCGCATGAA TCCTTCCAATCTAGTTGAGG
<i>Праймеры для анализа экспрессии генов мРНК</i>			
<i>ND2</i>	146	for rev	ATGGCCTTCCTCACCTAGT GTTAGGGGGCGTATGGGTTC
<i>CytB</i>	130	for rev	CACGCTTCTTCGCATTCCAC GGGATTTTGTCTGCGTCGGA
<i>ATP5O</i>	110	for rev	GCTGAAAATGGTCGCCTAGG AGGAAACGCTGTGGTCAC
<i>Mfn1</i>	146	for rev	CGCCTGTCTGTTTTGGTTGA GCATTGACTTCACTGGTGCA
<i>Fis1</i>	110	for rev	AAAGAGGAGCAGCGGGATTA TGGGGCTCAGTCTGTAACAG
<i>PGC-1α</i>	121	for rev	GCACCAGAAAACAGCTCCAA TTGCCATCCCGTAGTTCACT
<i>TFAM</i>	115	for rev	ATCAAGACTGTGCGTGCATC AGAACTTCACAAACCCGCAC
<i>β-Actin</i>	147	for rev	TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG CAATGCCTGGGTACATGGTG
Мыши			
<i>Праймеры для анализа повреждений ДНК (ПЦР-ПФ)</i>			
<i>мтДНК</i>	10,9 kb	for rev	GCCAGCCTGACCCATAGCCATAATAT GAGAGATTTTATGGGTGTAATGCGG
<i>яДНК</i>	8,7 kb	for rev	TTGAGACTGTGATTGGCAATGCCT CCTTTAATGCCCATCCCGGACT
<i>кор мтДНК</i>	117	for rev	CCCAGCTACTACCATCATTCAGT GATGGTTTGGGAGATTGGTTGATGT
<i>кор яДНК</i>	110	for rev	CTGCCTGACGGCCAGG GGAAAAGAGCCTCAGGGCAT
<i>Праймеры для анализа количества копий мтДНК</i>			
<i>ND4</i>	115	for rev probe	ATTATTATTACCCGATGAGGGAACC ATTAAGATGAGGGCAATTAGCAGT FAM-ACGCCTAAACGCAGGGATTTATTTCCCTA-BHQ1
<i>GAPDH</i>	214	for rev probe	GTGAGGGAGATGCTCAGTGT CTGGCATTGCTCTCAATGAC ROX-TAAGAAACCCTGGACCACCCACCCC-BHQ2
<i>β-actin</i>	110	for rev probe	CTGCCTGACGGCCAGG GGAAAAGAGCCTCAGGGCAT ROX-CATCACTATTGGCAACGAGCGGTTCC- BHQ-2

Праймеры для анализа мутантных копий мтДНК			
<i>ND3</i>	534	for rev	AGCTCTCCATTTATTGATGAGG GAGGTTGAAGAAGGTAGATGGC
<i>D-loop 2</i>	437	for rev	AGGCATGAAAGGACAGCAC ATAAGGCCAGGACCAAACC

2.12. Определение количества копий мтДНК относительно яДНК методом ПЦР в реальном времени

Относительное количество копий мтДНК определяли методом количественной ПЦР на оборудовании GeneAmpPCR system 7500 («Applied Biosystems», США) с использованием подхода TaqMan («Applied Biosystems», США) [374]. Количественную оценку числа копий мтДНК проводили по генам *ND4* или *mPHK*, в качестве эндогенного контроля использовали ядерные гены *GAPDH* и β -актина. Для подсчета относительного количества мтДНК использовали формулу $2^{-\Delta\Delta CT}$. Регистрацию флуоресценции проводили по трем повторам для каждого анализа. Олигонуклеотиды и их последовательность представлены в таблице 2. Условия проведения ПЦР были следующими: 5 мин при 95°C, при 40 циклах – 95°C / 30 сек, 60°C / 1 мин. Анализ подсчета относительного количества копий мтДНК проводился с помощью ПО GeneAmpPCR system 7500 («Applied Biosystems», США), версия 3.0. За 100% были взяты данные контрольные группы.

2.13. Определение повреждения и восстановления яДНК и мтДНК методом количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК

Для определения повреждения и репарации яДНК и мтДНК использовался метод количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК (ПЦР-ПФ) [375].

Принцип действия данного метода заключается в том, что некоторые типы повреждений (разрывы, аддукты, димеры, сшивки и т.д.) могут блокировать синтез цепи ДНК, в результате чего наблюдается снижение продукта ПЦР, что позволяет судить об изменении количества неповрежденных копий ДНК (Рис. 2).

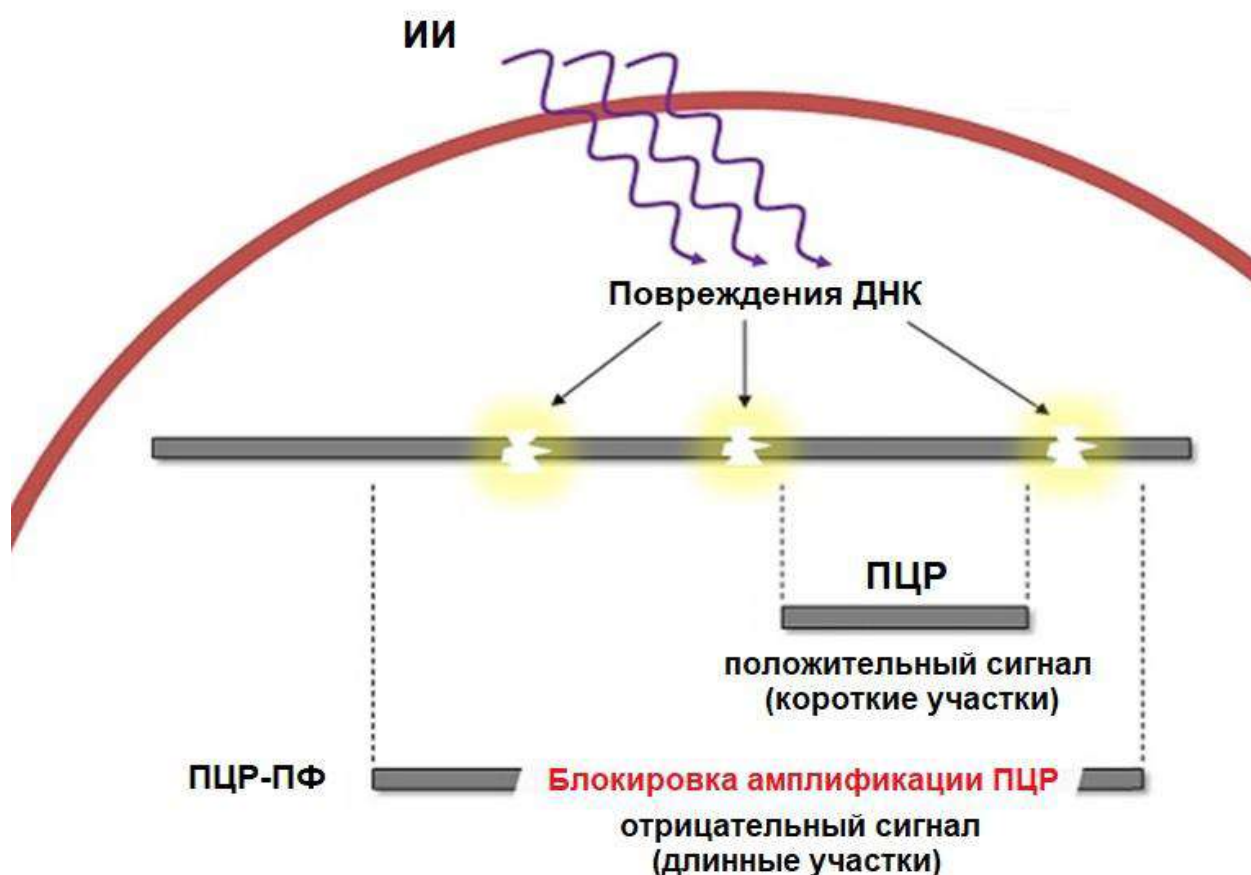


Рисунок 2 – Схема метода количественной ПЦР на протяженных фрагментах ДНК (ПЦР-ПФ) (пояснение в тексте).

Для амплификации протяженных ампликонов использовали (2U/мкл) КАРА Long Range Hot Start Kit («КАРА Biosystems», США). Праймеры для ПЦР, использованные в этих анализах, приведены в таблице 2. Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Для

амплификации длинных фрагментов мтДНК стандартная программа термоциклера включала начальную денатурацию при 94°C в течение 5 минут, с 18 циклами при 94°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 12,5 минут и с конечной элонгацией при 72°C в течение 10 мин. Для амплификации длинных фрагментов яДНК программа включала начальную денатурацию при 94°C в течение 5 минут и 28 циклов при 94°C в течение 30 секунд и 68°C в течение 12 минут с конечной элонгацией при 72°C в течение 10 минут. Предварительные анализы были проведены для обеспечения линейности амплификации ПЦР по отношению к числу циклов и концентрации ДНК. Поскольку амплификация небольшой области была бы относительно независимой от окислительного повреждения ДНК (низкая вероятность), небольшие фрагменты ДНК для яДНК и мтДНК также амплифицировали для нормализации данных, полученных с большими фрагментами. ПЦР-анализы проводили в трех экземплярах для каждого образца ДНК. Все амплифицированные продукты были разделены и визуализированы с помощью электрофореза в агарозном геле и количественно оценены с помощью системы Image Quant («Molecular Dynamics», USA) или VarsaDoc («Bio-Rad», USA).

2.14. Определение мутантных копий мтДНК

Анализ доли мутированных фрагментов мтДНК проводили с помощью специального набора Surveyor Mutation Detection Kit («Transgenomic», США), согласно инструкциям фирмы [376]. Входящая в состав набора растительная эндонуклеаза (Surveyor Nuclease) строго специфически разрезает обе нити ДНК (с 3' стороны) на участках с неспаренными основаниями, включая все замены оснований, вставки и делеции. Данный метод включает стадии получения ПЦР-ампликонов из фрагментов, полученных из тканей облученных и контрольных животных. Далее получение гетеродуплексов путем гибридизации этих ПЦР-ампликонов облученных

и контрольных животных, и обработка полученных гетеродуплексов ферментом Surveyor Nuclease с последующим разделением продуктов ее расщепления электрофорезом (рис. 3).

Реакционная смесь ПЦР (общий объем 25 мкл) содержала: 75 mM Трис-HCl, pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.5 mM MgCl_2 , 200 мкМ каждого dNTP, 250 нМ каждого праймера, 0.01% твин-20. В реакционную смесь вводили 1 нг ДНК и 1 суммарную единицу смеси Taq-и Pfu-полимераз («Thermo Fisher Scientific», США), которую вносили методом «горячего старта» после первичной денатурации ДНК-матриц при 94°C в течение 4 минут. ПЦР проводили в режиме 35 циклов: денатурация 30 секунд при 94°C, отжиг 45 секунд при 62°C и элонгация 45 секунд при 72°C, после которых - завершающая инкубация 4 минуты при 72°C. Праймеры для ПЦР, использованные в этих анализах, приведены в таблице 2. ПЦР проводилась на программируемом термоциклере Терцик («НПФ-ДНК-Технология», Москва).

После завершения реакции, все продукты ПЦР образцов ДНК были доведены до одинаковой концентрации путем добавления ТЕ буфера. Для получения гетеродуплексов смешивали равные объемы (по 7 мкл) ПЦР-ампликонов мтДНК облученных и контрольных животных, а также, ПЦР-ампликонов мтДНК двух контрольных животных. Смеси нагревали при 99°C в течение 10 мин и медленно охлаждали до 40°C (в течение 70 мин) при скорости снижения температуры 0.3°C/мин. Затем образцы выдерживали 45 мин при комнатной температуре. К смеси гетеродуплексов добавляли 1/10 объема 0,15 М раствора MgCl_2 , 1 мкл Surveyor Enhancer S и 1 мкл Surveyor Nuclease S. Смесь инкубировали при 42°C в течение 60 мин. Затем реакцию останавливали добавлением 1/10 объема Stop-раствора в соответствии с протоколом производителя («Transgenomic», США). Продукты расщепления эндонуклеазой анализировали с помощью электрофореза в 2,0% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. ПЦР-тестирование гетеродуплексов проводили в трех экземплярах для каждого образца ДНК. Интенсивность флуоресценции полос ДНК в гелях регистрировали с помощью AlphaImager Mini

System («Alpha Innotech», США). Отношение флуоресценции продуктов расщепления к общей интенсивности флуоресценции полос ДНК в геле (% ДНК, расщепленной Surveyor Nuclease) рассчитывали с использованием пакета программ ImageJ («Wayne Rasband», США).

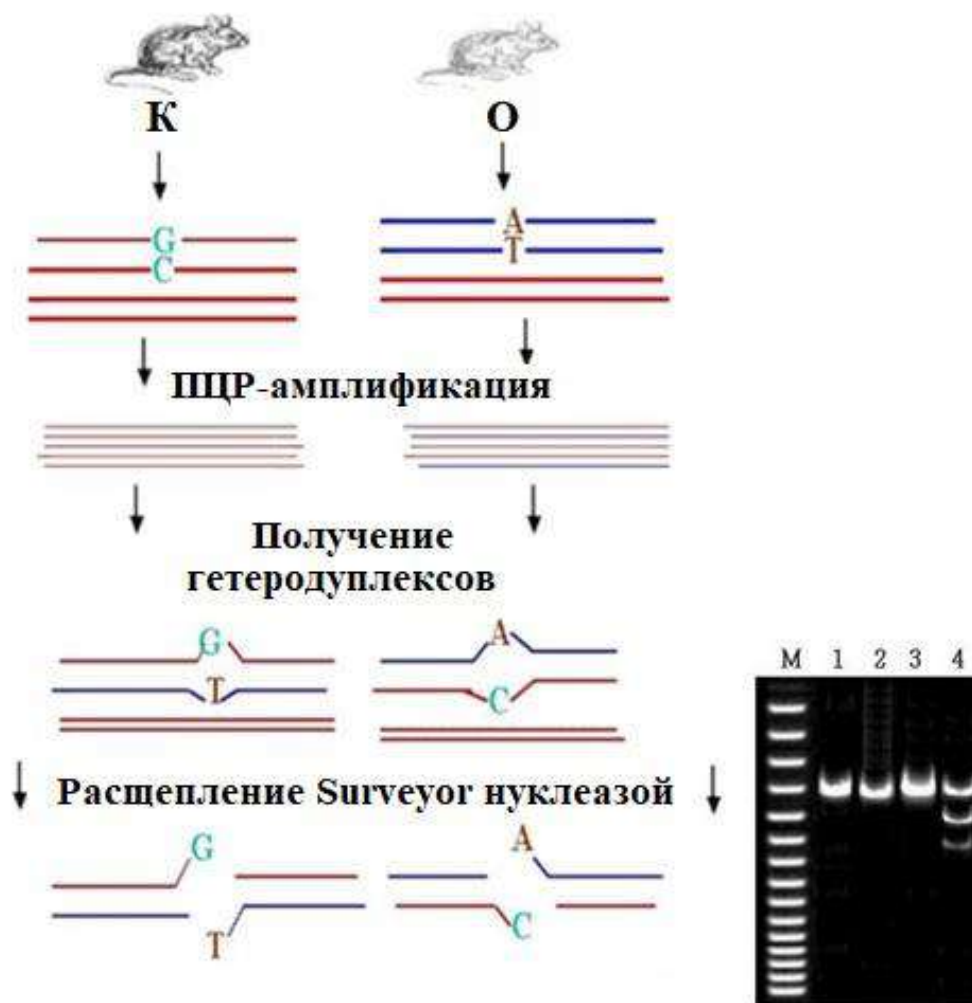


Рисунок 3 – Схема метода выявления мутаций мтДНК с использованием Surveyor эндонуклеазы (пояснение в тексте). К – контрольные; О – облученные.

2.15. Биохимические анализы уровней пероксида водорода, АТФ, малонового диальдегида и восстановленного глутатиона

Для количественного определения содержания перекиси водорода (H_2O_2) в тканях мышей использовали набор Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit 165 («Sigma-Aldrich», США). В этом наборе используется субстрат пероксидазы, генерирующий красный флуоресцентный продукт, уровень которого анализируется в 96 луночных черных микропланшетах с прозрачным дном. Все процедуры анализов проводили согласно рекомендациям производителя. Количество H_2O_2 рассчитывали на основе стандартной кривой, полученной с использованием концентрационного ряда раствора H_2O_2 , полученного путем разбавления 30% раствора H_2O_2 сверхчистой водой. Каждый тестируемый образец был выполнен в трех экземплярах. Данные получены от мышей по 6 шт. в каждой группе. Количество H_2O_2 выражали в наномолях на мг белка, с использованием стандартной кривой. Белок в этих и других анализах оценивали по методу Lowry et al [377] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Содержание АТФ определяли, придерживаясь рекомендации указанных в работе [378]. АТФ из гомогенатов тканей извлекали после удаления белков ТЕ-буфером насыщенным фенолом. Для измерения уровня АТФ использовали люциферин-люциферазный набор с микропланшетным люминометром GloMax 96 («Promega», США). Для оценки концентрации АТФ использовали стандартную кривую в нмоль на мг белка. Данные были нормализованы к общему белку, а уровень тканевого АТФ выражен в $\mu\text{моль}$ на 100 мг белка.

Изменение содержания МДА в ткани селезенки мы определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), согласно методу Бюге и Ауста [368]. Для этого ткани селезенки гомогенизировали в лизисном буфере (50 мМ Трис-Cl, 1% NP-40, 0,2% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 150 мМ NaCl и 1 мМ ЭДТА). Далее один объем лизата тканей смешивали с двумя объемами реагента ТБК (15% ТХУК,

0,375% ТБК и 0,25 н HCl) с последующей инкубацией при 90°C в течение 30 мин. После охлаждения реакционную смесь центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Поглощение супернатанта измеряли при 533 нм. Уровень перекисного окисления липидов рассчитывали по содержанию МДА в наномолях на миллиграмм белка.

Содержание ГЛТ оценивали по методу Элмана [379]. Ткани гомогенизировали в лизисном буфере, как указано при определении МДА. К 0,2 мл гомогената ткани добавляли 1,8 мл 0,05 М ЭДТА и 3 мл осаждающего реагента (содержащего 1,67 г HPO_3 , 0,2 г двуназатриевой соли ЭДТА и 30 г NaCl на 1 литр воды). После тщательного перемешивания смесь выдерживали в течение 5-7 мин, затем центрифугировали. Этот шаг способствует отделению ГЛТ (в супернатанте) от остальной части белков и других клеточных элементов (в осадке). Затем к одному объему супернатанта добавляли два объема 0,3 М раствора Na_2HPO_4 и 0,5 объема DTNB (5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты). Поглощение определяли при 412 нм против смеси растворов без добавок биоматериала. ГЛТ оценивали в наномолях на мг белка, с использованием стандартной кривой.

2.16. Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, США). Для оценки значимости различий применяли критерий Стьюдента и непараметрические критерии Манна-Уитни. В экспериментах на выживание различия между группами сравнивали по точному критерию Фишера. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартная ошибка среднего ($\pm$ SEM). Статистическая значимость была установлена при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование репарации яДНК, восстановления уровня копий мтДНК, а также экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании, регуляции биогенеза и динамики митохондрий в разных структурах головного мозга крыс (гиппокамп, кора, мозжечок) после радиационного воздействия

Результаты эпидемиологических исследований лиц, выживших после атомной бомбардировки, а также пациентов, перенесших радиотерапию опухолей, указывают, что критическими отдаленными последствиями радиационного повреждения мозга являются когнитивные нарушения и индукция онкогенеза [380, 381, 436]. Если радиационная индукция опухолей мозга обусловлена в основном повреждением глиальных клеток, то возникновение когнитивных дисфункций во многом определяется повреждением нервных стволовых клеток и нарушением нейрогенеза в гиппокампе [382, 436]. Хотя результаты многих исследований на разных уровнях выявили различные структурно-функциональные нарушения в разных отделах головного мозга после радиационного воздействия, многое еще остается неопределенным. Особенно это касается выяснения начальных молекулярно-клеточных нарушений, провоцирующих дальнейшее развитие нейродегенеративных и других отдаленных последствий [436].

Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что в развитии нейродегенеративных нарушений и инициации онкогенеза ключевую роль играют нарушения функций митохондрий [383, 384, 436]. Известно, что активность нейронов головного мозга зависит от чрезвычайно высокого уровня энергетической поддержки в виде молекул АТФ, поставляемых митохондриями. Накопленные за последние годы результаты исследований указывают, что важнейшей мишенью радиационного поражения, наряду с ядром, являются митохондрии. Структурные и

функциональные нарушения, индуцируемые радиацией в этих органеллах, оказывают влияние на пострadiaционное развитие целого комплекса эффектов на уровне клеток и целого организма животных и человека [436].

Митохондриальные функции тесно связаны с целостностью мтДНК. Число копий мтДНК на клетку в ткани мозга более чем в 2–3 раза выше, чем в клетках печени и десятки раз выше, чем в других тканях [385, 386, 436]. Повреждение мтДНК полностью отражается на функциях митохондрий [387, 436] с нарушением активности комплексов окислительного фосфорилирования и усилением генерации активных форм кислорода и азота (АФК/А), сопряженной с синтезом АТФ. При этом согласно данным, полученным на различных клетках, повышенная генерация АФК/А сохраняется в течение длительного пострadiaционного времени и приводит к резкому усилению оксидативного стресса в облученных клетках [11, 332, 436]. Усиление отсроченного окислительного стресса в клетках, подвергшихся радиационному воздействию, может вызвать повреждения ядерного генома и инициацию его нестабильности [88, 436], которая занимает центральное место в индукции канцерогенеза [388, 436]. Нестабильность генома также является фактором нейродегенеративных заболеваний [389, 436].

Поэтому в ходе выполнения данного этапа работы были изучены репарация ядерной ДНК (яДНК) и изменения целостности митохондриальной ДНК (мтДНК), а также экспрессия генов, поддерживающих функции митохондрий, в трех областях головного мозга (гиппокамп, кора и мозжечок) крыс после рентгеновского облучения всего тела в дозе 5 Гр [436].

На рисунке 4 представлены результаты анализов по оценке наличия повреждений и их репарации в мтДНК и яДНК в участках головного мозга (гиппокампа, коры и мозжечка) крыс, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения. На рисунке 4А представлены образцы электрофореграмм ПЦР-ПФ ампликонов мтДНК и яДНК, а на рисунке 4Б даны результаты количественного анализа полученных продуктов ПЦР-ПФ [436].

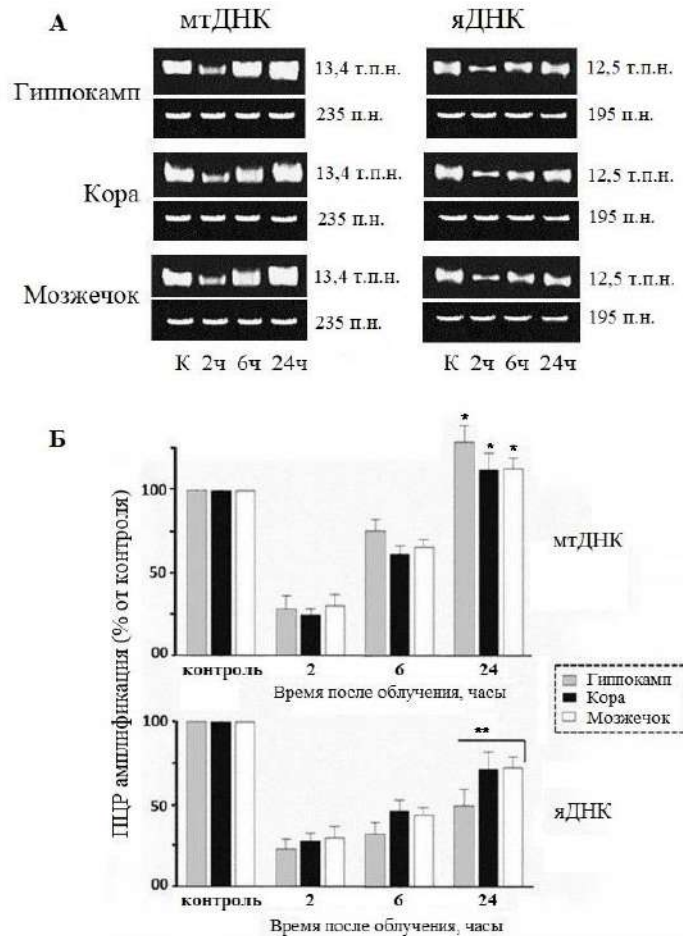


Рисунок 4 – Анализ повреждений и репарации мтДНК и яДНК в разных отделах головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Амплифицировали длинные фрагменты мтДНК (13,4 тыс. п.н.) и яДНК (12,5 тыс. п.н.). Эти данные были нормализованы к коротким фрагментам мтДНК (235 п.н.) и яДНК (195 п.н.), полученными с использованием того же образца ДНК. (А) – Гель-электрофорез продуктов ПЦР-ПФ мтДНК и яДНК, извлеченных из разных отделов головного мозга крыс через 2, 6 и 24 ч после облучения (здесь и на других рисунках контроль – необлученные крысы). (Б) – Количественный анализ ампликонов ПЦР-ПФ мтДНК и яДНК, извлеченных из разных отделов головного мозга крыс через 2, 6 и 24 ч после облучения. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Можно видеть, что уровень синтезируемых продуктов ПЦР-ПФ яДНК и мтДНК, выделенных из участков головного мозга крыс через 2 часа после их облучения, существенно ниже по сравнению с таковым у контрольных (необлученных) крыс. Этот результат указывает на наличие повреждений в образцах яДНК и мтДНК облученных крыс. Результаты анализов показывают также, что количество амплифицируемых продуктов ПЦР-ПФ становится больше при введении в реакционную смесь образцов ДНК, выделенных из участков мозга крыс через 6 и 24 часа после их облучения. Очевидно, что возрастание количества синтезированного продукта в реакциях с этими образцами ДНК обусловлено снижением повреждений, способных снижать активность ДНК-полимеразы [436].

Вместе с тем, видно, что синтез ампликонов мтДНК, при введении в реакцию образцов общей ДНК из трех участков мозга крыс, выделенных через 24 после их облучения, происходит более активно, чем таковой в реакции с яДНК. При этом синтез ампликонов мтДНК из всех трех участков мозга одинаково возрастает, достигая результатов, получаемых с контрольными образцами мтДНК. Однако, столь активного роста ПЦР-ПФ-ампликонов как с мтДНК, в случае реакции с яДНК, не наблюдалось. Более того, результаты, полученные с яДНК, из трех участков мозга различаются. В этом случае, статистически достоверные повышения продуктов ПЦР-ПФ выявляются в реакциях с образцами яДНК из коры и мозжечка, по сравнению, с таковым с яДНК выделенной из гиппокампа этих же крыс. Если полагать, что увеличение синтеза продукта ПЦР-ПФ яДНК в пострadiационный период обусловлено репарацией части ее повреждений, способных блокировать ДНК-полимеразу, то вряд ли это может быть связано с относительно резким увеличением синтеза продуктов мтДНК из этих же тканях мозга. В данном случае, можно полагать, что наблюдаемое увеличение продукта ПЦР-ПФ мтДНК обусловлено, скорее всего, пострadiационной активацией биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК в тканях мозга облученных крыс [436].

Предполагаемая пострadiaционная активация биогенеза митохондрий согласуется с результатами анализов, полученных методом ПЦР в реальном времени, которые показывают, что количества копий мтДНК увеличиваются относительно яДНК в регионах головного мозга крыс (гиппокампа, коры и мозжечка) в течение 6-24 часов пострadiaционного времени (рис. 5) [436].

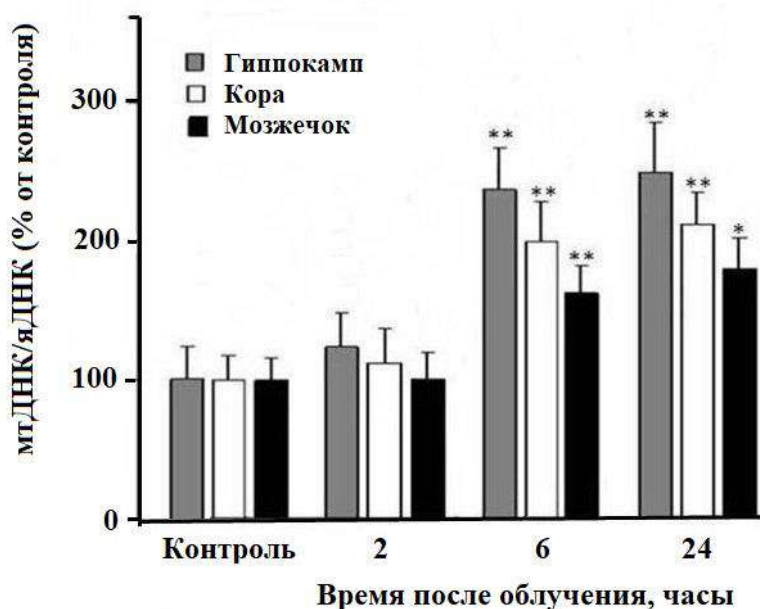


Рисунок 5 – Содержание фрагментов мтДНК, относительно яДНК в разных отделах головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

При инициации репликативного синтеза с вовлечением поврежденных мтДНК, посредством ДНК-полимеразы γ , можно было ожидать появление новых копий мтДНК с мутациями и делециями в клетках головного мозга крыс, после их облучения ИИ [436].

Результаты анализов мутантных копий мтДНК в разных отделах головного мозга крыс, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр представлены на рисунке 6.

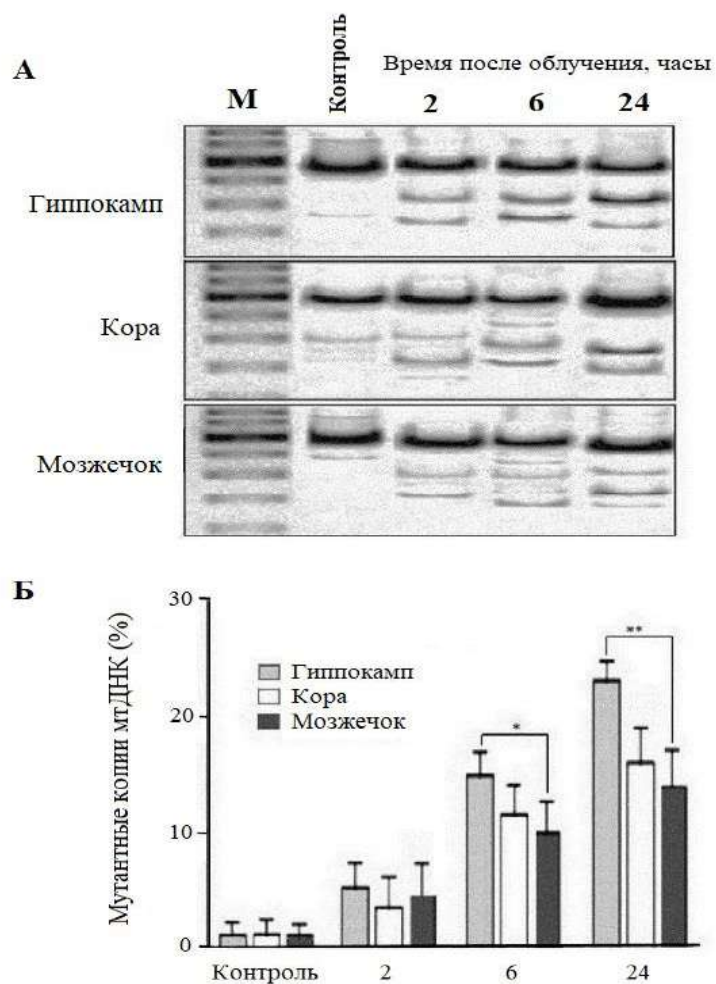


Рисунок 6 – Анализ мутантных копий мтДНК в разных отделах головного мозга крыс через 2, 6 и 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. (А) – Электрофореграммы продуктов расщепления нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (ген *tRNA*, 507 п.н.). (Б) – Процент расщепления нуклеазой гетеродуплексов. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Данные показывают, что во всех трех участках головного мозга облученных крыс возникает резкое увеличение количества мутантных копий мтДНК (рис. 6А). Так, к 24 часам после облучения количество мутантных копий мтДНК в участках мозга достигает около 10-20% от общего количества копий мтДНК в этих тканях (рис. 6Б) [436].

В регионе гиппокампа наблюдается самый больший активный рост мтДНК с мутациями. Так, в гиппокампе статистически достоверное повышение мутантных копий мтДНК, по сравнению с данными анализа мтДНК коры и мозжечка, наблюдается к 6 и 24 часам после облучения крыс (рис. 6Б) [436].

Аналогичные результаты по определению уровня мтДНК и их мутантных копий в разных тканях мозга крыс были получены после краниального воздействия протонов (150 MeV) в дозах 3 и 5 Гр [436].

На рисунке 7 представлены результаты анализов, полученных методом ПЦР в реальном времени, которые показывают, что количества копий мтДНК увеличиваются относительно яДНК в регионах мозга крыс (гиппокампа, коры и мозжечка) в течение 2-24 часов после краниального облучения в дозах 3 и 5 Гр. При этом максимальные повышения количества копий мтДНК регистрировалось в гиппокампе. Синтез с вовлечением поврежденных молекул мтДНК посредством ДНК-полимеразы γ , как было сказано ранее, может происходить с появлением новых копий мтДНК с мутациями и делециями в клетках головного мозга крыс после их облучения [436].

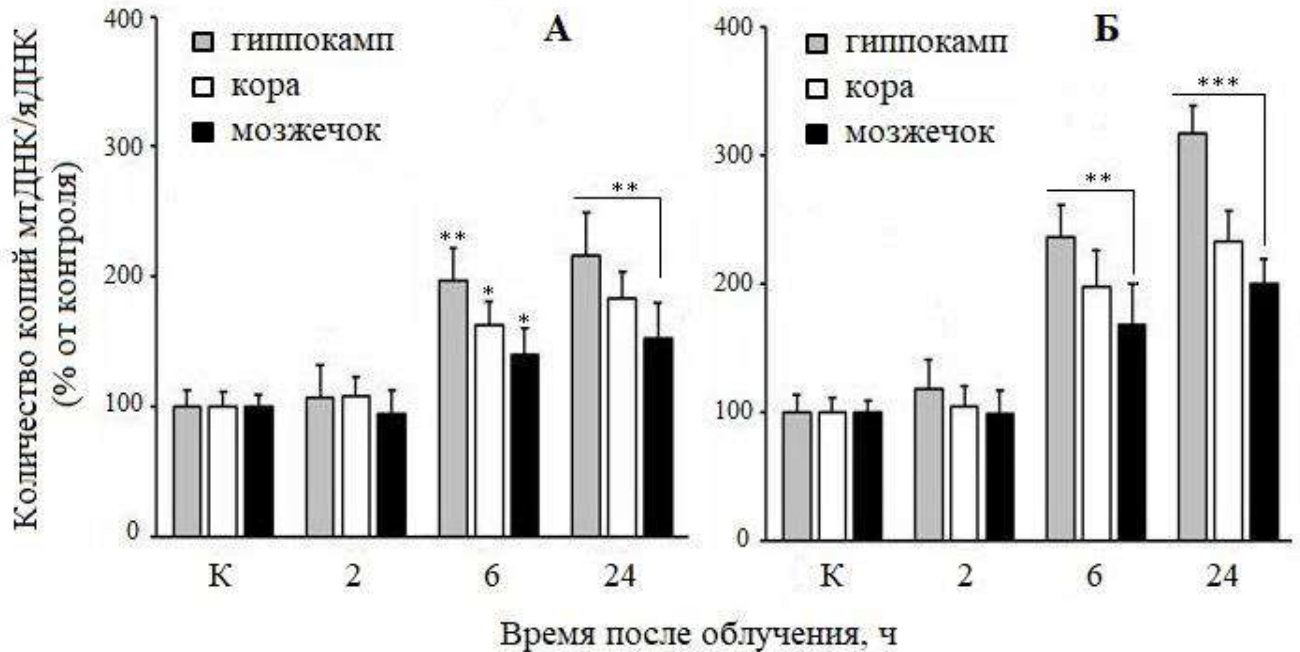


Рисунок 7 – Активация синтеза мтДНК в тканях разных отделов мозга крыс через 2, 6, 24 часа после облучения головы протонами 150 МэВ. По оси абсцисс: время после облучения; по оси ординат: изменение соотношения уровня ПЦР ампликонов мтДНК (по гену тРНК) к яДНК (по гену GAPDH) в % относительно контроля. (А) - крысы, облученные в дозе 3 Гр; (Б) - крысы, облученные в дозе 5 Гр. Здесь и на рисунке 9 статистическая значимость была установлена на уровне p значений <0.05 (*), <0.01 (**), <0.001 (***), $p < 0.05$ считалось статистически значимым.

Для оценки мутантных копий мтДНК дополнительно использовались временные точки через 2 недели, 1 и 2 месяца после облучения в дозе 3 Гр. От исследований после облучения в дозе 5 Гр на эти же сроки воздержались так, как возможна гибель крыс при облучении протонами. На рисунке 8 изображены типичные электрофореграммы продуктов Surveyor-эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК. Степень расщепления этим ферментом гетеродуплексов зависит от наличия в них сайтов с неспаренными основаниями,

которые могли формироваться благодаря наличию мутаций в определенном количестве копий мтДНК в тканях головного мозга облученных крыс [437].

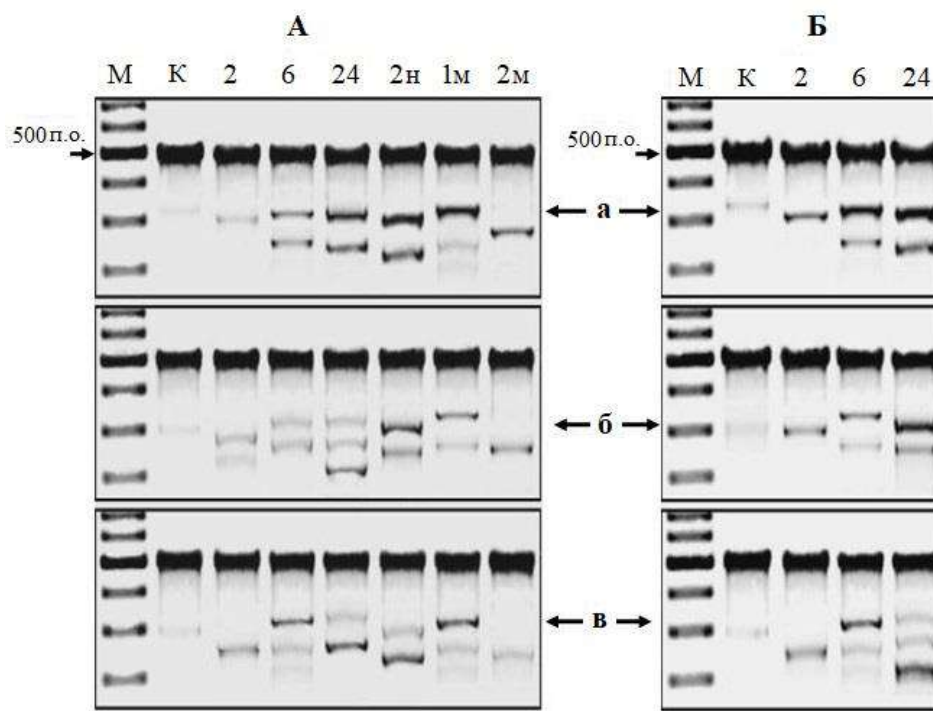


Рисунок 8 – Электрофорез гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (507 bp) из тканей разных отделов мозга крыс после облучения головы протонами 150 МэВ. Анализы проводились после обработки гетеродуплексов ПЦР-ампликонов образцов мтДНК, посредством Surveyor-нуклеазой, специфически узнающей неспаренные основания (мутантные сайты мтДНК). (А) - крысы, облученные в дозе 3 Гр; (Б) - крысы, облученные в дозе 5 Гр. Время после облучения, часы (после облучения в дозе 3 Гр: часы, недели, месяцы); а - гиппокамп, б - кора, в - мозжечок. К - гетеродуплексы ампликонов мтДНК необлученных крыс, М - маркер молекулярного веса. Электрофоретически подвижные фрагменты - результат расщепления мутантных копий мтДНК.

На электрофореграммах можно заметить также, что количество продуктов эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов различается в зависимости от дозы облучения и времени после облучения крыс. Суммарное количество продукта, отщепленного эндонуклеазой от гетеродуплексов, регистрируемое в данных анализах, можно условно считать соответствующим числу мутантных копий в амплифицируемых образцах одинакового количества общей ДНК, выделенных из тканей головного мозга крыс [437].

Для сравнительного анализа результатов исследования количественно регистрировался процент отщепившихся продуктов (% расщепления гетеродуплексов), в результате действия Surveyor-эндонуклеазы, по отношению к интегральной интенсивности полос ДНК на гелях электрофореграмм, как указано выше. Обобщенные результаты независимых повторных анализов продуктов, отщепляемых гетеродуплексов, представлены на рисунке 9 [437].

Результаты анализов показывают, что во всех трех участках головного мозга облученных крыс в дозах 3 и 5 Гр возникает резкое увеличение количества мутантных копий мтДНК (Рис. 9). Так, к 24 часам после облучения в дозе 5 Гр количество мутантных копий мтДНК в участках мозга достигает около 25-35% от общего количества копий мтДНК в этих тканях. При облучении крыс в дозе 3 Гр максимальный уровень мутантных копий мтДНК регистрируется через 2 недели и составляет около 20-30%, в последующие же сроки после облучения крыс количество мутантных копий существенно снижается. В регионе гиппокампа наблюдается самый больший активный рост мтДНК с мутациями. Так, в гиппокампе статистически достоверное повышение мутантных копий мтДНК, по сравнению с данными анализа мтДНК коры и мозжечка, наблюдается к 6 и 24 часам после облучения крыс в дозе 5 Гр (Рис. 9). При облучении крыс в дозе 3 Гр в гиппокампе статистически достоверное повышение мутантных копий мтДНК, по сравнению с данными анализа мтДНК коры и мозжечка, регистрируется через 24 часа и 2 недели после их облучения [437].

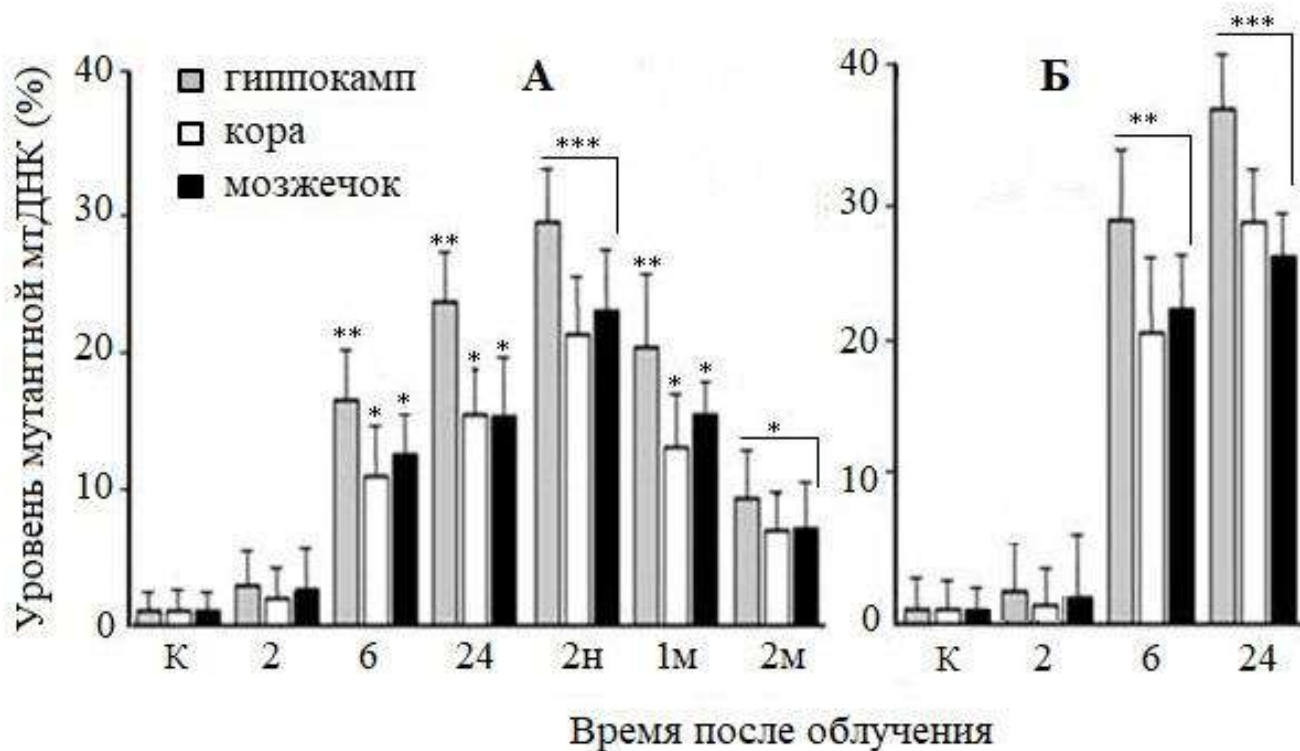


Рисунок 9 – Изменение относительных уровней (гетероплазмии) мутантных копий мтДНК (% расщепления Surveyor-нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК) в тканях разных отделов мозга крыс после облучения головы протонами 150 МэВ. А - крысы, облученные в дозе 3 Гр; Б - крысы, облученные в дозе 5 Гр. По оси абсцисс: время после облучения часы (после дозы 3 Гр: часы, дни, месяцы); по оси ординат: количество мутированной мтДНК в % к общей мтДНК.

Таким образом, полученные результаты показывают, что увеличение количества копий мтДНК в различных участках головного мозга крыс, облученных как X-лучами, так и протонами сопряжено появлением копий мтДНК с мутациями [436, 437].

Появление новых мутантных копий мтДНК может привести к митохондриальной дисфункции с повышением окислительного стресса в регионах головного мозга [436].

Результаты анализа экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании в трех областях мозга у крыс, облученных рентгеновским излучением, показаны на рисунке 10.

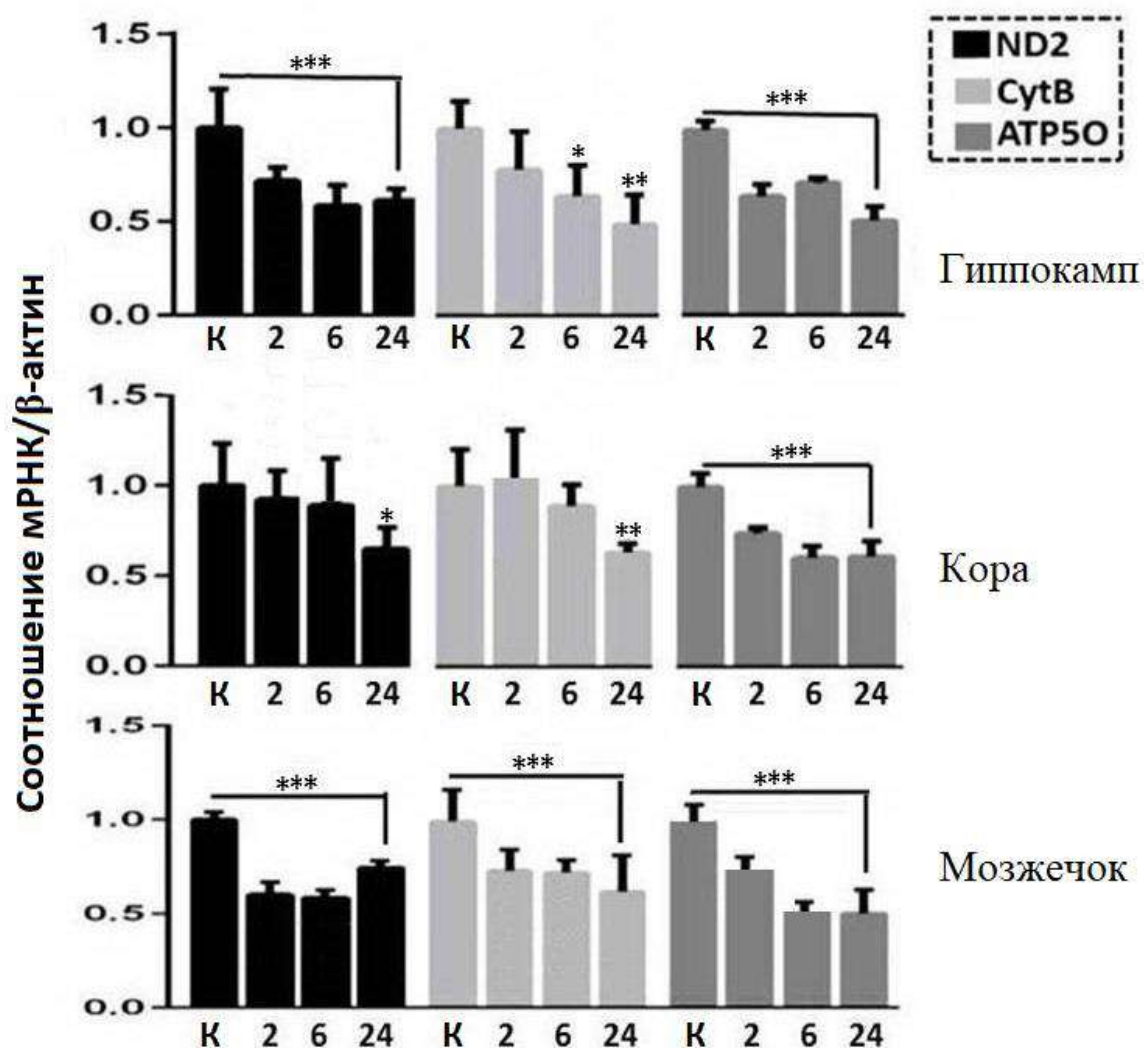


Рисунок 10 – Изменение экспрессии генов окислительного фосфорилирования (*ND2*, *CytB*, *ATP5O*) в различных отделах головного мозга крыс через 2, 6, 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. К – контрольные (необлученные крысы). Уровень экспрессии генов у необлученных крыс выражен как 1. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов.

Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Эти результаты включают информацию, полученную после анализа транскриптов генов, кодируемых мтДНК (*ND2* является компонентом комплекса I, а *CytB* является компонентом комплекса III), а также ядерным ДНК-кодируемый ген *ATP5O*, компонент комплекса V (субъединица АТФ-синтазы). По результатам анализов достоверное снижение экспрессии трех генов (*ND2*, *CytB*, *ATP5O*) регистрировалось во всех тканях мозга крыс через 24 часа после их облучения. Более выраженное снижение экспрессии этих генов в постлучевой период наблюдается в гиппокампе и мозжечке (рис. 10) [436].

Результаты анализа экспрессии двух генов яДНК, кодирующих митохондриальную транскрипцию фактор А (*TFAM*) и гамма-коактиватор рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа (*PGC-1*), которые участвуют в регуляции репликации, транскрипции мтДНК и митохондриальных биогенеза, представлены на рисунке 11 [436].

На этом же рисунке представлены результаты анализа уровней транскриптов генов *Mfn1*, *Fis1*, регулирующих слияние и деление митохондрий. Полученные данные показывают, что к 24 часам пострadiационного времени происходит значительное увеличение транскриптов *TFAM* и *PGC-1* в трех областях головного мозга. Что касается генов *Mfn1* и *Fis1*, контролирующих слияние и деление митохондрий, то изменение их экспрессии регистрировалось только в гиппокампе. Снижение экспрессии *Mfn1* и *Fis1* в гиппокампе возникает через 6 и 24 ч после воздействия рентгеновского излучения (рис. 11) [436].

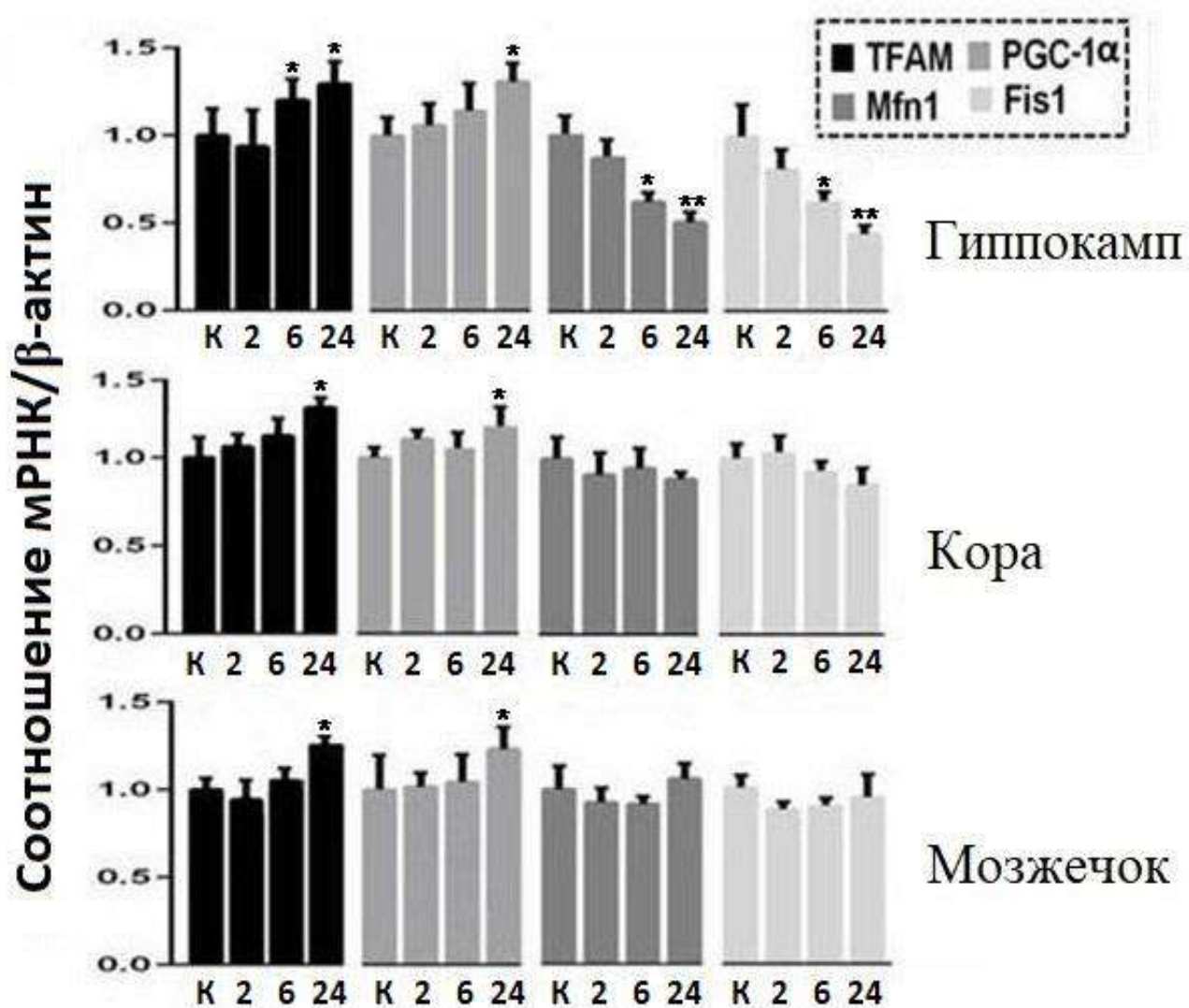


Рисунок 11 – Изменение экспрессии генов регуляции биогенеза, транскрипции (*TFAM*, *PGC-1α*) и динамики митохондрий (*Mfn1*, *Fis1*) в различных отделах головного мозга крыс через 2, 6, 24 часа после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. К – контрольные (необлученные крысы). Уровень экспрессии генов у необлученных крыс выражен как 1. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Итак, в митохондриях в трех областях головного мозга после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр происходит резкое снижение экспрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании. Кроме того, происходит увеличение активности ядерных генов, контролирующих митохондриальный биогенез в тканях мозга облученных крыс [436].

Таким образом, полученные результаты показывают, что репарация повреждений яДНК в различных отделах мозга крыс, после воздействия рентгеновского излучения, протекает медленно. Однако наблюдается активация синтеза мтДНК с повышенным уровнем гетероплазмии (мутантных копий мтДНК). Очевидно увеличение количества копий мтДНК является результатом активации ядерных генов, контролирующих биогенез митохондрий. Можно полагать, что повышенный уровень гетероплазмии мтДНК приводит к пертурбации работы комплексов окислительного фосфорилирования и генерации повышенного уровня АФК/А, которые индуцируют дополнительные повреждения яДНК. Снижение экспрессии ядерных генов, регулирующих динамику митохондрий, вероятно, способствует уменьшению элиминации дисфункциональных органелл из ткани мозга, воздействуя, прежде всего, на клетки гиппокампа. Наблюдаемые изменения в разных областях головного мозга облученных крыс, могут привести к развитию отсроченных эффектов воздействия радиации. В связи с этим дальнейшие анализы уровня гетероплазмии мтДНК были проведены в более поздние сроки после рентгеновского облучения [436].

3.2. Определение уровней мутантных копий и общего количества копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки мышей в зависимости от дозы облучения и пострadiaционного периода

На рисунке 12 представлены типичные образцы электрофореграмм гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (гипервариабельного участка D-loop) после их инкубации с Surveyor эндонуклеазой. Можно видеть, что во всех случаях подавляющая часть гетеродуплексов (тяжелая полоса, около 400 п.н.) не поддается расщеплению этой эндонуклеазой. Вместе с тем на большинстве электрофореграмм видны полосы продуктов ферментного расщепления многих гетеродуплексов. Гетеродуплексы, полученные путем смешения ПЦР-ампликонов мтДНК тканей от двух необлученных мышей не подвержены существенному расщеплению Surveyor эндонуклеазой. Однако гетеродуплексы, полученные путем гибридизации ампликонов мтДНК облученных и контрольных мышей, Surveyor эндонуклеаза частично расщепляет. Это можно видеть на электрофореграммах гетеродуплексов, полученных гибридизацией ампликонов мтДНК контрольных мышей с ампликонами мтДНК мышей, облученных в дозах 1–5 Гр (рис. 12) [438].

Степень расщепления этим ферментом гетеродуплексов зависит от наличия в них сайтов с неспаренными основаниями, которые могли формироваться благодаря наличию мутаций в определенном количестве копий мтДНК из тканей облученных мышей. Растительная Surveyor эндонуклеаза строго специфически разрезает обе нити ДНК (с 3' стороны) на участках с неспаренными основаниями (включая все замены оснований, вставки и делеции) [390, 438]. На электрофореграммах можно заметить также, что количество продуктов эндонуклеазного расщепления гетеродуплексов, полученных путем смешения ампликонов мтДНК контрольных и облученных мышей, различается. Это различие зависит от дозы облучения и времени (8–28 сут) после облучения мышей (рис. 12) [438].

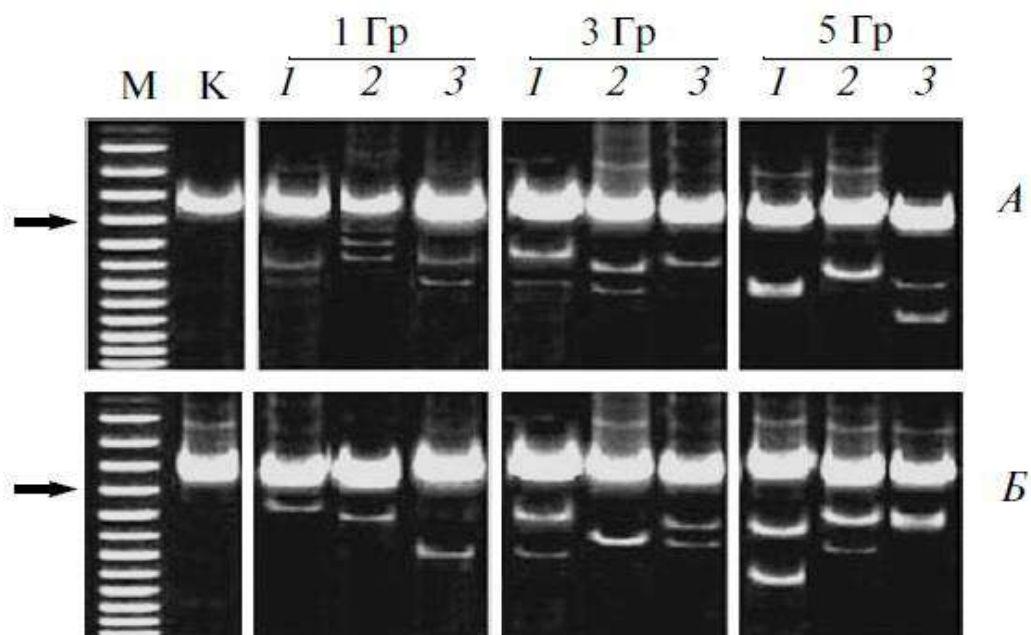


Рисунок 12 – Электрофореграммы продуктов расщепления Surveyor эндонуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (D-loop 2) тканей головного мозга и селезенки необлученных и облученных мышей (в дозах 1, 3, 5 Гр). М – маркер (стрелкой указан 400 п.н.). К – гетеродуплексы ампликонов мтДНК двух необлученных мышей, 1–3 – гетеродуплексы ампликонов мтДНК необлученных и облученных мышей соответственно через 8, 14, 28 сут после облучения. (А) – мтДНК головного мозга, (Б) – мтДНК селезенки.

На рисунке 13 представлены анализы содержания мутантных копий мтДНК в тканях мозга и селезенки облученных мышей (в дозах 1-5 Гр).

Из представленных данных, видно, что с увеличением дозы облучения мышей увеличивается и доля мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки. Как показано на кривых, если максимальные значения содержания мутантных копий мтДНК (% расщепления гетеродуплексов) регистрируется на 8-й день после облучения мышей, то в последующие пострadiационные сроки (14, 28 дни) можно видеть их резкое снижение [438].

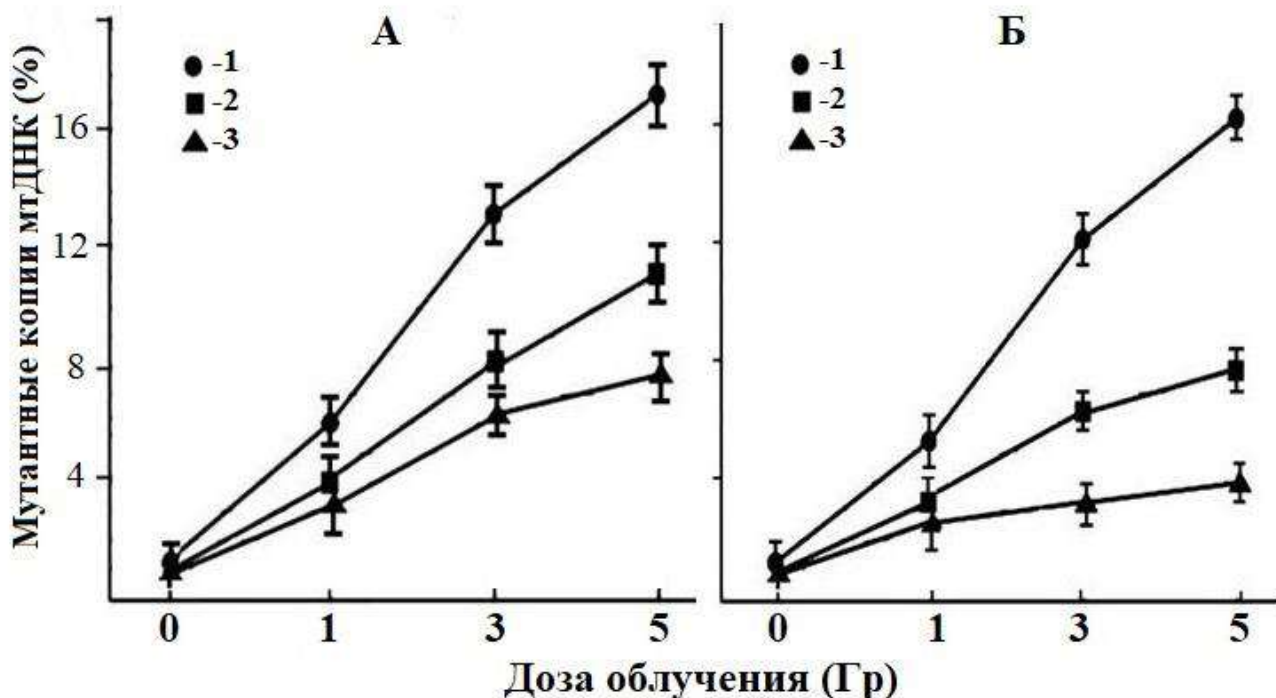


Рисунок 13 – Содержание мутантных копий мтДНК (ген *D-loop 2*) в тканях головного мозга (А) и селезенки (Б) мышей после облучения в разных дозах. По оси абсцисс – доза облучения (Гр), по оси ординат – % расщепления гетеродуплексов. 1, 2, 3 - время после облучения через 8, 14, 28 дней.

Причем, это снижение более активно происходит в ткани селезенки, чем в ткани мозга. Наблюдаемое снижение мутантных копий мтДНК в тканях облученных мышей в пострadiационный период, возможно, связано с их селективной элиминацией или со снижением общего содержания копий мтДНК в этих тканях. Для выяснения этого вопроса необходимо было определить динамику изменения общего содержания копий мтДНК в тканях облученных мышей [438].

Результаты по определению изменения общего содержания копий мтДНК (по гену *ND4*) относительно яДНК (ген *GAPDH*) в тканях головного мозга и селезенки мышей после их облучения в дозах 1-5 Гр представлены на рисунке 14.

Видно, что статистически значимых изменений количества копий мтДНК в тканях мышей не регистрируется после их облучения (на 8-28 дни) в дозах 1 и 3 Гр. Однако содержание общего количества копий мтДНК в тканях облученных мышей (в дозе 5 Гр) на 25-40% достоверно ниже данных контрольной группы (рис. 14) [438].

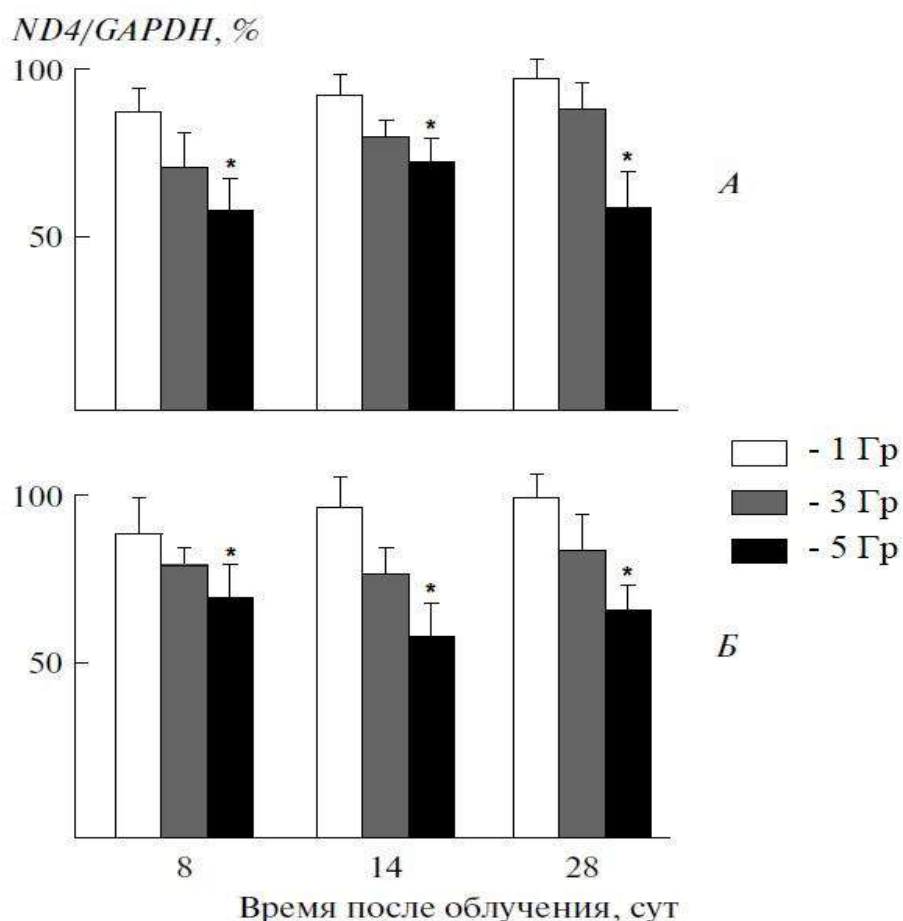


Рисунок 14 – Изменение отношения количества копий мтДНК (ген *ND4*) к количеству яДНК (ген *GAPDH*) в тканях головного мозга (А) и селезенки (Б) мышей, облученных в дозах: 1, 3 и 5 Гр. По оси абсцисс (8, 14, 28) - дни после облучения; по оси ординат - отношение *ND4* к *GAPDH* в процентах. За 100% приняты данные контрольных мышей. Данные представлены как среднее $\pm$ SEM от 4-5 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$.

Таким образом, был обнаружен повышенный уровень мутантных копий мтДНК в тканях облученных мышей, который снижается в последующие сроки пострadiaционного времени. Был зарегистрирован относительно стабильный уровень общего количества мтДНК в тканях облученных мышей в пострadiaционный период, хотя он остается существенно ниже (при дозе облучения 5 Гр), чем в тканях контрольных животных [438].

3.3. Изменения количества внеклеточных мутантных копий и общего содержания копий мтДНК в плазме крови мышей в пострadiaционный период

На рисунке 15А представлены образцы электрофореграмм гетеродуплексов ПЦР-ампликонов участка *D-loop* 2 вк-мтДНК плазмы после их инкубации с “Surveyor” нуклеазой. Вк-мтДНК, использованная в этих анализах (рис. 15), получена из плазмы мышей через 8, 14, 28 дней после облучения в дозах 1-5 Гр [438].

Можно видеть, что гетеродуплексы ПЦР-ампликонов вк-мтДНК плазмы необлученных мышей не подвержены существенному расщеплению “Surveyor” нуклеазой. Однако гетеродуплексы, полученные из ампликонов вк-мтДНК облученных мышей (в дозах 1-5 Гр), частично расщепляет “Surveyor” нуклеаза. Анализы электрофореграмм позволили определить процент ферментативного расщепления гетеродуплексов (рис. 15Б) [438].

Из представленных данных видно, что возрастание доли мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей зависит от дозы облучения. Однако следует отметить, что доля мутантных копий вк-мтДНК в составе общей циркулирующей вк-ДНК плазмы облученных мышей значительно выше, чем в составе общей ДНК, выделенной из тканей этих же мышей (рис. 13 и рис. 15) [438].

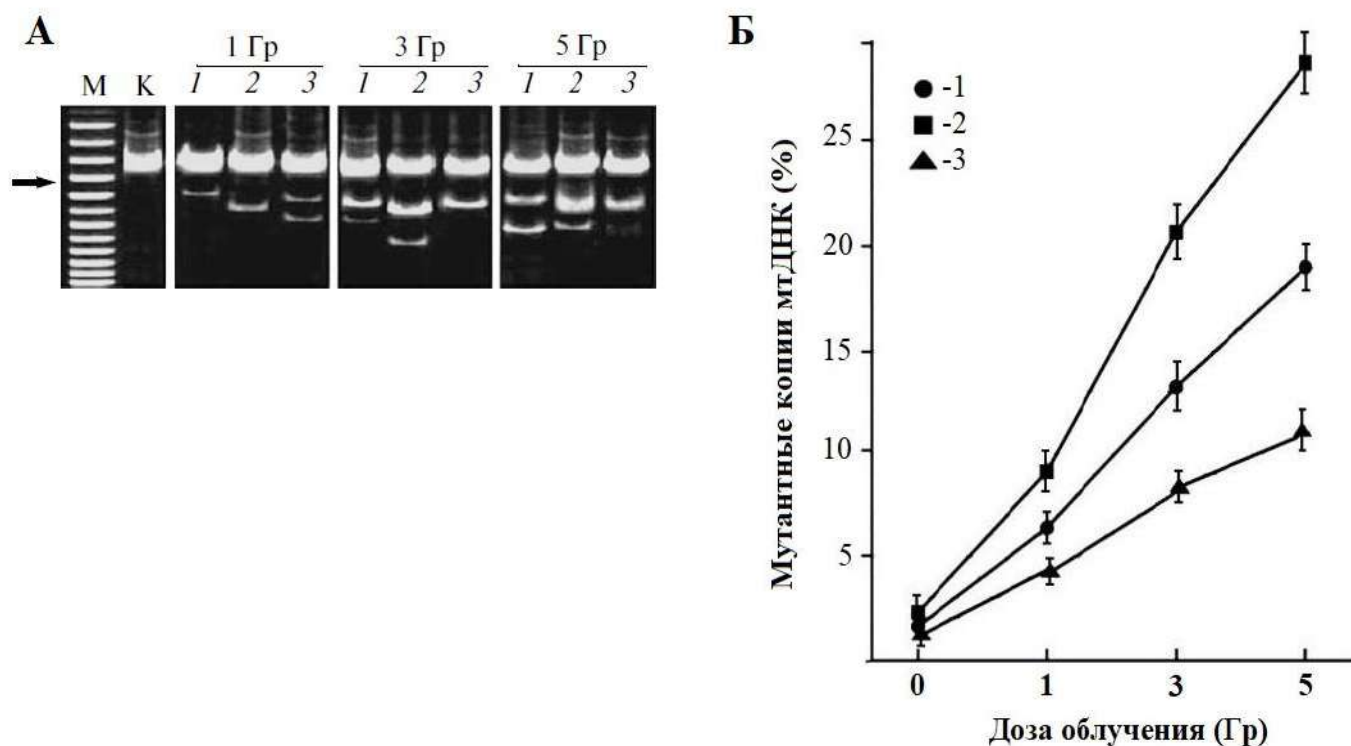


Рисунок 15 – Анализ мутантных копий вк-мтДНК в плазме крови облученных мышей (в дозах 1, 3 и 5 Гр). (А) Электрофореграммы продуктов расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (ген *D-loop* 2, 437 п.н.). (Б) Процент расщепления нуклеазой гетеродуплексов.

1, 2, 3 – гетеродуплексы ампликонов мтДНК облученных мышей соответственно через 8, 14, 28 дней после облучения. К – гетеродуплексы ампликонов мтДНК необлученных мышей.

Более того, здесь мы видим иной характер изменения уровня содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме мышей в пострadiационный период. Если в тканях облученных мышей максимальное содержание мутантных копий мтДНК наблюдается на 8-й день после облучения (рис. 13), то наибольшее количество вк-мтДНК с мутациями в плазме мы регистрируем на 14-й день после облучения (рис. 15). Однако, доля мутантных копий вк-мтДНК в составе циркулирующей ДНК

плазмы крови мышей, как и в тканях, также резко снижается на 28-й день после их облучения [438].

На рисунке 16 представлены результаты анализов содержания общего количества копий фрагментов вк-мтДНК в плазме мышей после их облучения в дозах 1-5 Гр.

В этих опытах наблюдался повышенный уровень вк-мтДНК в плазме крови облученных мышей, по сравнению с данными от контрольных животных, особенно на 8 и 14 дни пострadiационного периода. Видно, что содержание вк-мтДНК в составе циркулирующей ДНК плазмы у мышей зависит от дозы облучения и времени после облучения (рис. 16). При этом максимальное повышение количества копий мтДНК в плазме крови облученных мышей было, как и при анализе мутаций мтДНК, на 14 день пострadiационного времени. Опять же, резкое снижение содержания вк-мтДНК в плазме мышей регистрируется на 28 день относительно данных, полученных на 14 день после их облучения [438].

Таким образом, содержание мтДНК с мутациями в тканях и в плазме облученных мышей резко меняется не только в зависимости от дозы облучения животных, но и от времени после облучения. Полученные данные позволяют полагать, что в кровоток облученных мышей в течение длительного пострadiационного периода поступает значительное количество вк-мтДНК, определенная часть которой представлена мутантными копиями [438].

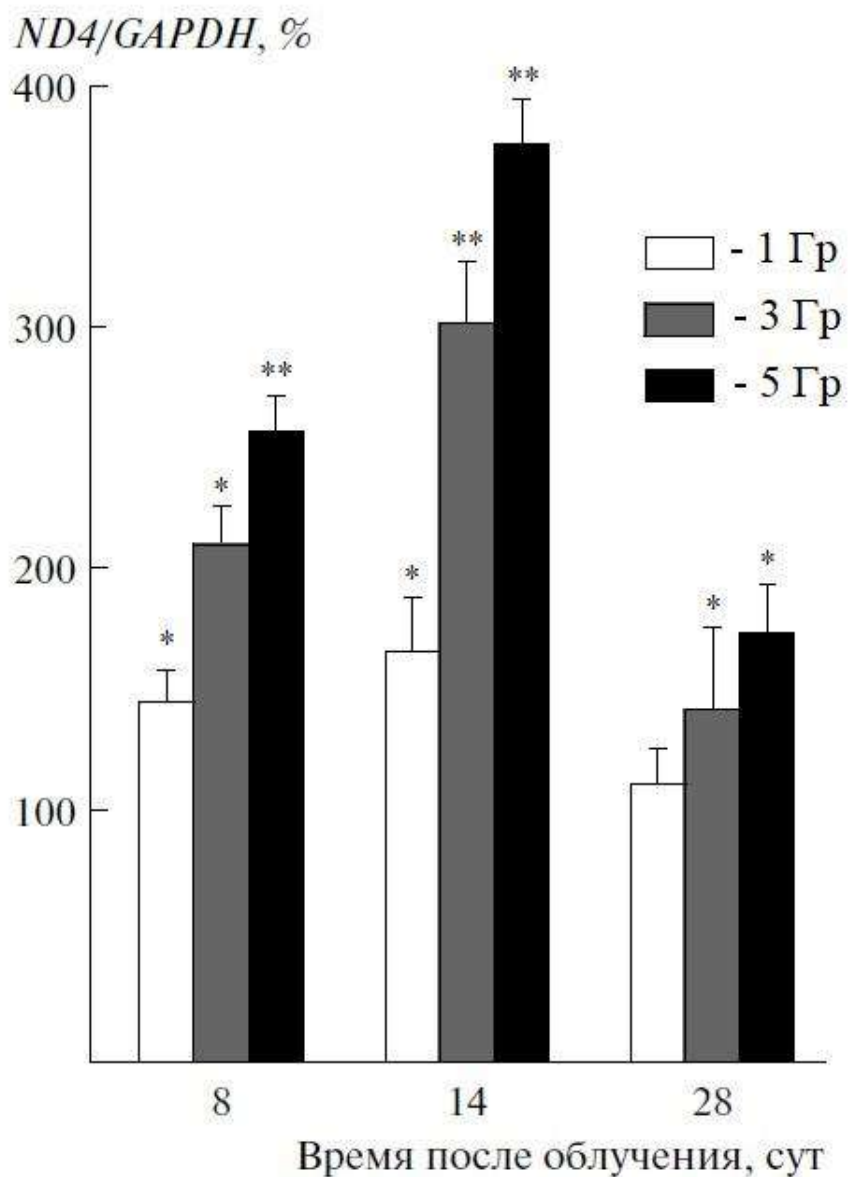


Рисунок 16 – Отношение количества копий вк-мтДНК (ген *ND4*) к количеству вк-ядДНК (ген *GAPDH*) плазмы мышей, облученных в дозах 1, 3 и 5 Гр. По оси абсцисс: (8, 14, 28) дни после облучения; по оси ординат: отношение *ND4/GAPDH* в процентах. За 100% приняты данные контрольных мышей.

3.4. Исследование содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, подвергнутых воздействию ионизирующего излучения и цитостатического препарата блеомицина

Циркулирующие фрагменты вк-мтДНК и вк-яДНК, поступающие в кровоток облученных животных, возможно, подвергаются нуклеазной деградации, но определенная ее часть, защищенная от действия нуклеаз, может оказаться в моче, как трансренальная ДНК [290, 432].

Моча является традиционно широко используемым материалом, который содержит огромное разнообразие продуктов метаболизма, чрезвычайно удобных для поиска специфических биомаркеров для диагностики различных патологий [325, 432]. Исследования вк-мтДНК и вк-яДНК в моче для прогностической и диагностической оценки патологии имеют очевидные преимущества, относительно таких же исследований с использованием плазмы/сыворотки как источника этих же образцов вк-ДНК животных или человека [290, 326, 391, 432]. Поэтому дальнейшие эксперименты были посвящены исследованию возможности перехода через “почечный барьер” вк-мтДНК, наряду с вк-яДНК в мочу мышей, подвергнутых радиационному воздействию, а также выявлению изменений их количественного содержания и уровня гетероплазии [432].

На первом этапе данного исследования выделенные образцы общей вк-ДНК (мтДНК, яДНК) из мочи, собранной у крыс до их облучения и после облучения в дозе 5 Гр, были подвергнуты электрофорезу в агарозном геле. Характерные для этих образцов ДНК электрофореграммы представлены на рисунке 17 [432].

По этим данным можно судить, что образцы ДНК, экстрагируемые из мочи крыс, собранных до их облучения и после облучения, представляют собой фрагменты размером около 400-500 п.о. Кроме того, они содержат также фракции более высокого молекулярного веса, чем 400-500 п.о., а также низкомолекулярные фрагменты (рис. 17) [432].

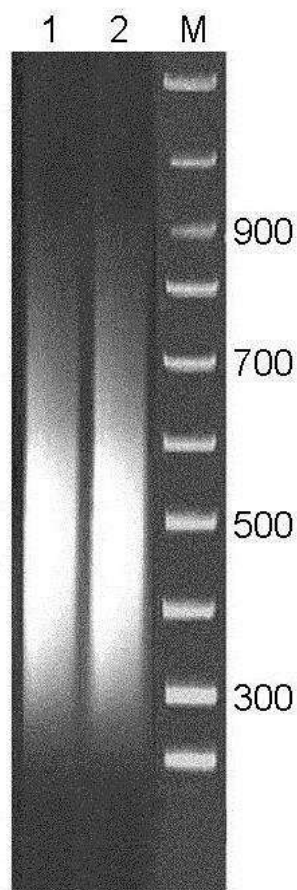


Рисунок 17 – Электрофорез вк-ДНК, выделенной из мочи крысы, 1% агарозный гель. 1 – ДНК из мочи крысы, собранной до облучения; 2 – ДНК из мочи крыс, собранная через 6 часов после облучения (5 Гр); М – маркер молекулярного веса.

На рисунке 18 представлены образцы кинетических кривых количественной ПЦР-РВ вк-мтДНК и вк-яДНК выделенных из мочи крыс, собранных до облучения и через 6 часов после облучения [432].

Из рисунка видно, что экспоненциальная стадия роста продуктов амплификации вк-мтДНК начинается раньше, чем у вк-яДНК. Меньшее число циклов, необходимых для достижения порогового уровня указывает на наличие большего числа копий мтДНК, по сравнению с яДНК. Эффективность реакции и

заданный уровень пороговой флуоресценции были одинаковы для каждой из сравниваемых реакций [432].

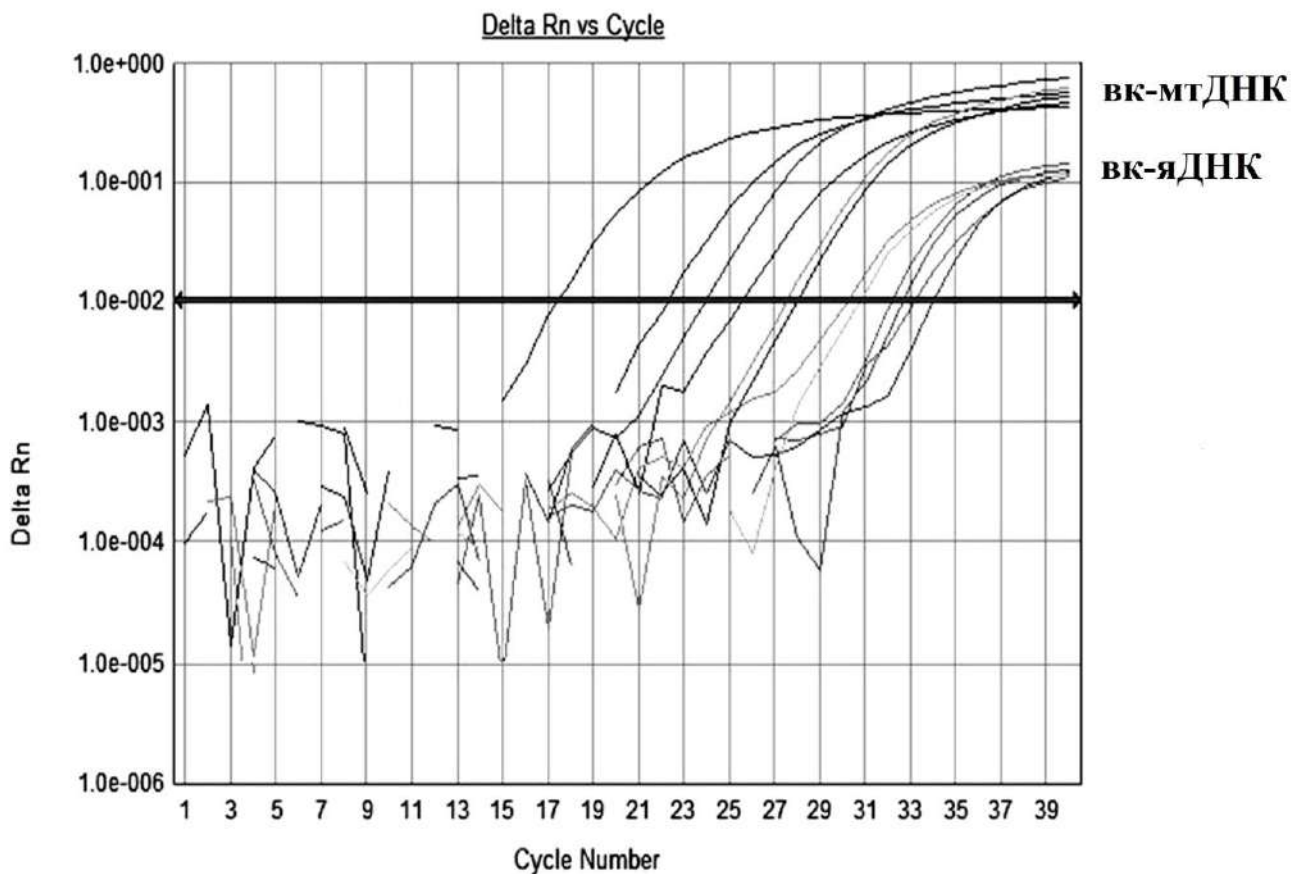


Рисунок 18 – Кривые амплификации ПЦР в режиме реального времени для vk-мтДНК и vk-яДНК. Реакции ставили с образцами ДНК, выделенными из мочи разных крыс до их облучения.

Совокупные сравнительные данные изменения содержания vk-мтДНК и vk-яДНК в моче крыс, собранных до их облучения и после облучения (в дозах 3 и 5 Гр) в разные сроки пострadiационного времени (от 6 часов до 10 дней) представлены на рисунке 19 [432].

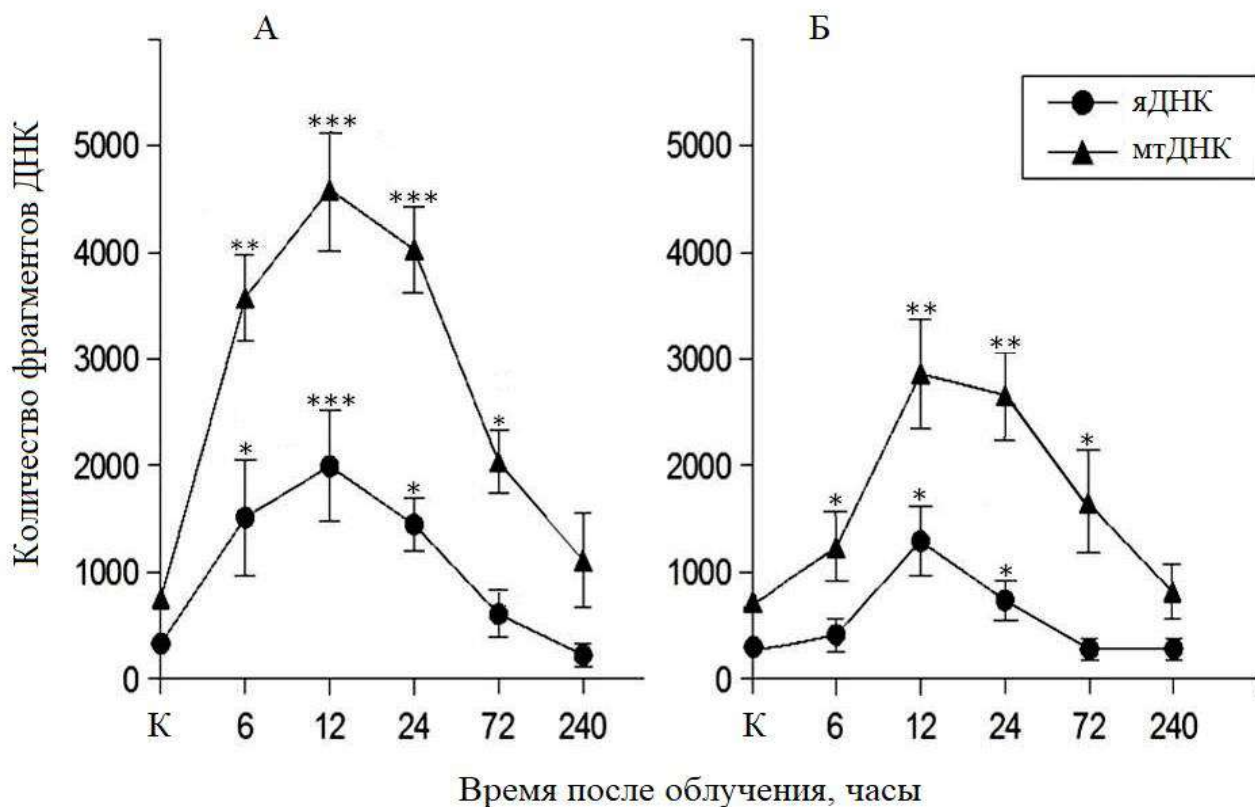


Рисунок 19 – Различие содержания фрагментов вк-мтДНК (ген *tRNA*) и вк-яДНК (ген *GAPDH*) в моче крыс, собранной до и после воздействия рентгеновского излучения. (А) – крысы, облученные в дозе 5 Гр; (Б) – крысы, облученные в дозе 3 Гр. Ордината – количество фрагментов ДНК (в относительных единицах); по оси абсцисс – время после облучения. К – контроль (вк-ДНК мочи крыс, собранной до облучения животных). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM (n=8). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Видно, что содержание вк-мтДНК и вк-яДНК в моче после облучения сначала возрастает, достигая максимума на 12-24-е часы пострadiaционного времени. В последующие же сроки после облучения (72 и 240 часов) происходило значительное понижение количества копий как вк-мтДНК, так и вк-яДНК. Причем, одинаковая

зависимость изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче в пострadiaционный период характерна при облучении крыс в дозах 3 и 5 Гр [432].

Полученные результаты также показывают, что при облучении в указанных дозах и при всех сроках пострadiaционных анализов содержание количества амплифицируемых копий вк-мтДНК в 2-3 раза выше, по сравнению с таковым вк-яДНК в моче крыс (рис. 16) [432].

Учитывая тот факт, что все структурные гены мтДНК являются однокопийными, можно заключить следующее: регистрируемая величина флуоресценции определяет количество копий фрагментов мтДНК, несущих амплифицируемый ген *tRNA*, в составе общей ДНК из мочи крыс. Результаты исследования показывают, что в составе общей вк-ДНК из мочи крыс соотношение мтДНК/яДНК остается примерно в пределах близких значений 2,8 (табл. 3) [432].

Таблица 3. Соотношение вк-мтДНК/вк-яДНК в моче крыс после облучения (по данным, представленным на рис. 19).

Доза, Гр	До облучения	Время после облучения, часы									
		6	* <i>p</i>	12	<i>p</i>	24	<i>p</i>	72	<i>p</i>	240	<i>p</i>
5	2.10±0.17	2.43 ±0.31	0.22	2.37 ±0.19	0.29	3.11 ±0.27	0.11	3.27 ±0.29	0.10	3.38 ±0.24	0.09
3	2.31±0.20	2.54 ±0.22	0.24	2.32 ±0.17	0.40	3.40 ±0.35	0.09	4.21 ±0.23	0.07	2.56 ±0.18	0.21

Это в одинаковой мере относится к результатам анализов общей вк-ДНК мочи крыс, собранных до их облучения и в разные сроки после облучения (при дозах 3 и 5 Гр). Данное соотношение вк-мтДНК/вк-яДНК представляется чрезмерно пониженным, если учитывать, что одна соматическая клетка тканей животных может содержать тысячи копий мтДНК [432].

Как было отмечено, ранее мы наблюдали в составе вк-мтДНК плазмы облученных мышей увеличение доли мутантных копий, выявляемых методом “Surveyor” нуклеазой. Анализы вк-мтДНК, изолируемых в составе общей вк-ДНК из мочи облученных крыс показывают, что трансрентальная вк-ДНК также содержит определенный процент мутантных копий фрагментов вк-мтДНК (рис. 20 и рис. 21) [432].

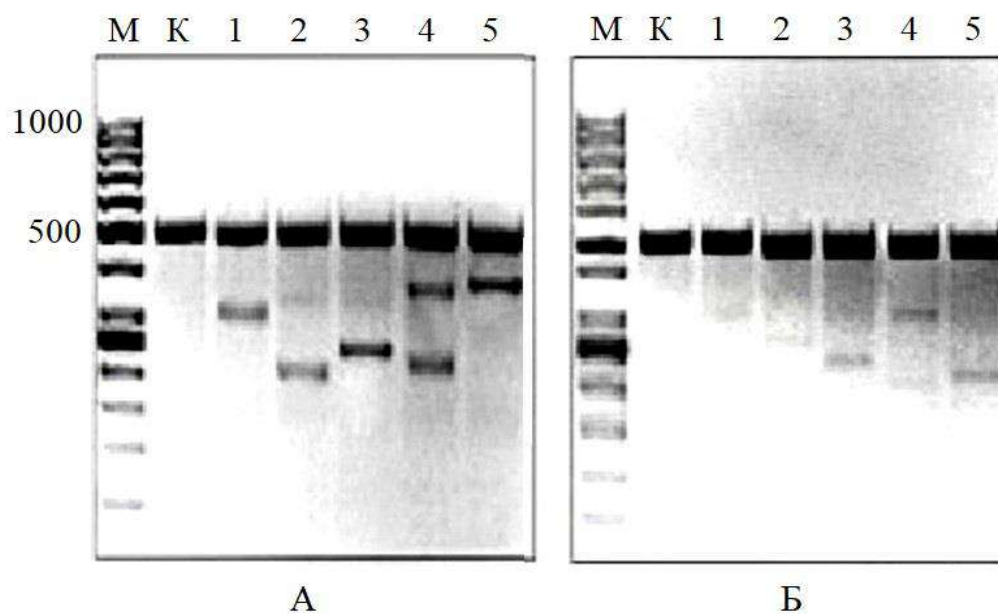


Рисунок 20 – Электрофорез продуктов расщепления Surveyor нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов вк-мтДНК из мочи крыс, собранной до облучения (К – контроль) и после облучения (1-5), соответственно 6, 12, 24, 72 и 240 часов. (А) – 5 Гр, (Б) – 3 Гр.

Здесь представлены типичные образцы электрофореграмм гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (по гену *tRNA*) после их обработки “Surveyor” нуклеазой (рис. 20). Можно видеть, что гетеродуплексы (тяжелая полоса) ПЦР-ампликонов, полученные от контрольных групп крыс (до облучения), не поддаются расщеплению этой нуклеазой. Вместе с тем, на электрофореграммах видно, что часть

гетеродуплексов полученных от крыс после облучения, подвергается эндонуклеазному расщеплению, что указывает на наличие в них неспаренных оснований. Суммарное количество продукта, отщепленного “Surveyor” нуклеазой от гетеродуплексов, регистрируемое в данных анализах, характеризует соответствующий процент мутантных копий в составе образцов вк-мтДНК, изолируемых из мочи облученных крыс [432].

Обобщенные результаты независимых повторных анализов продуктов, отщепляемых “Surveyor” нуклеазой от гетеродуплексов вк-мтДНК, представлены на рисунке 21.

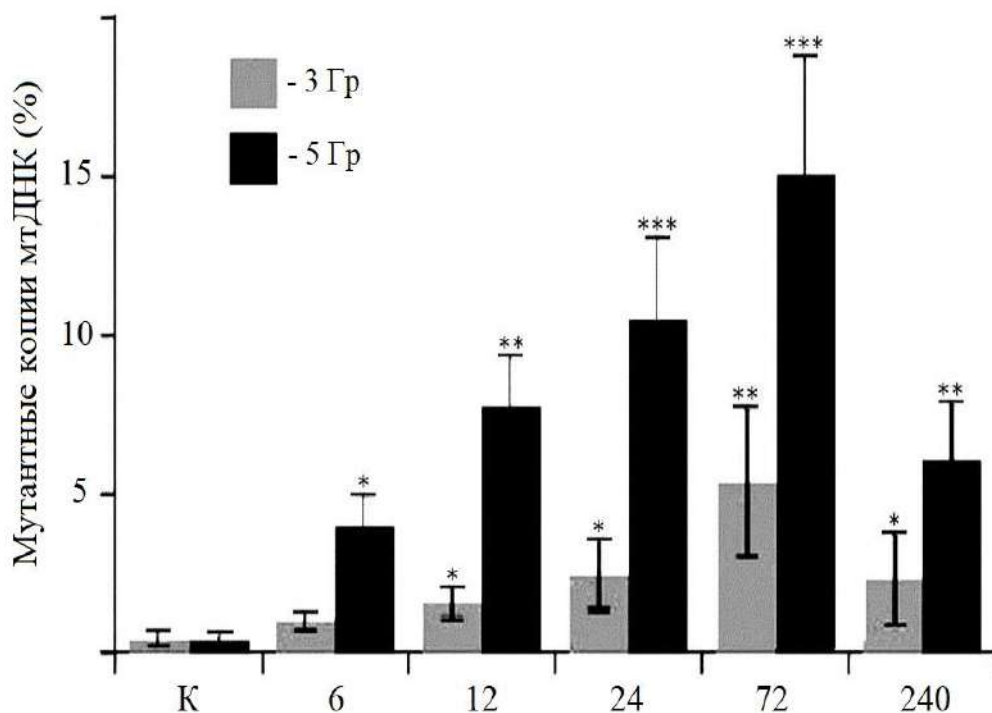


Рисунок 21 – Процент расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов вк-мтДНК из мочи крыс, собранной до облучения (К-контроль), и через 6, 12, 24, 72, 240 часов после облучения в дозах 3 и 5 Гр. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM (n=8). Статистическая значимость была установлена при значениях* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Видно, что в составе вк-мтДНК мочи крыс, собранных до их облучения, не регистрируется существенного содержания копий мтДНК с вновь возникшими мутациями. Согласно результатам представленных анализов, в моче крыс, после их облучения рентгеновскими лучами (в дозах 5 и 3 Гр), содержание вк-мтДНК и вк-яДНК резко повышается. Процент мутантных фрагментов вк-мтДНК в моче крыс, облученных в дозе 5 Гр, как можно было ожидать, больше, чем в образцах мочи облученных крыс в дозе 3 Гр [432].

Как видно из рисунка 21, наибольший процент содержания мутантных копий вк-мтДНК регистрируется в образцах ДНК, изолированных из мочи крыс, собранных через 72 часа после их облучения, хотя максимальное повышение общего содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс наблюдается к 12 часам пострadiaционного времени. Это позволяет предположить, что сроки формирования мутаций на поврежденных копиях мтДНК клеток тканей облученных животных не сопряжены с активным началом клеточной гибели [432].

Таким образом, полученные данные позволяют полагать, что в моче крыс, подвергнутых радиационному воздействию, в течение длительного пострadiaционного периода, поступает повышенное количество вк-мтДНК и вк-яДНК. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше, по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК из мочи облученных крыс содержит мутации, выявляемые с помощью метода “Surveyor” нуклеазы [432].

Следующие исследования были посвящены изучению пострadiaционного изменения содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс как облученных в широком диапазоне доз, так и после введения животным клинически применяемых доз блеомицина – химиотерапевтического препарата ДНК-тропного воздействия [439].

Результаты анализов изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче крыс, собранных до и после их облучения (в дозах 3, 5 и 8 Гр) в разные сроки пострadiaционного времени (от 6 до 72 ч) представлены на рисунке 22.

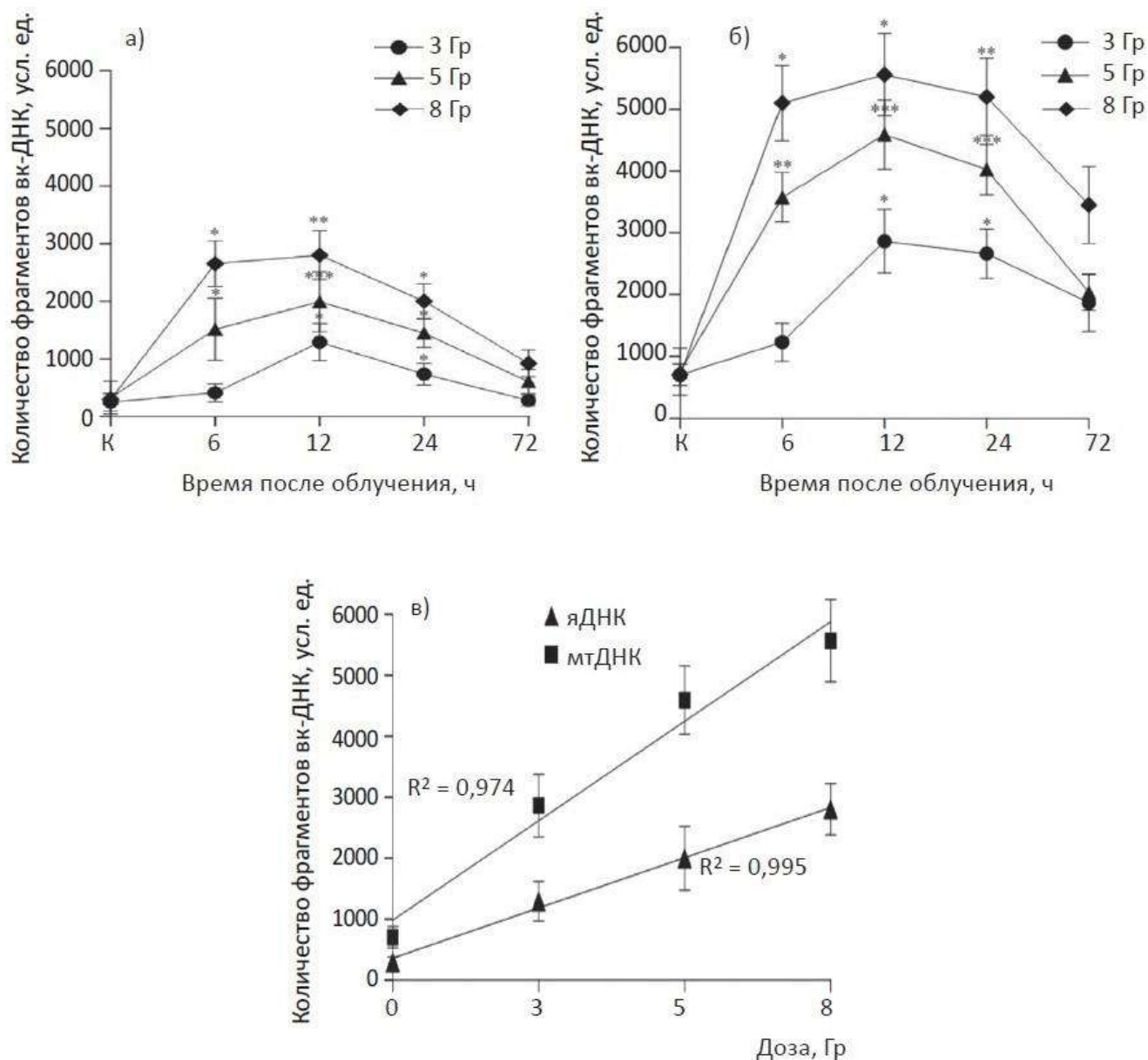


Рисунок 22 – Содержание фрагментов внеклеточной ДНК в моче крыс до и после воздействия рентгеновского излучения в дозах 3, 5 и 8 Гр. (а) – содержание фрагментов вк-яДНК; (б) – содержание фрагментов вк-мтДНК; (в) – содержание фрагментов вк-ДНК в зависимости от дозы облучения (12 часов); К – контроль (до облучения). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM ($n = 8$).

Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Эти результаты показывают, что уровни вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс существенно изменяются в зависимости от дозы облучения и пострadiaционного времени. Видно, что содержание вк-мтДНК и вк-яДНК в моче после облучения статистически значимо возрастает, достигая максимума на 12–24-е часы пострadiaционного времени. При этом одинаковая зависимость изменения содержания вк-мтДНК и вк-яДНК в моче в пострadiaционный период характерна при облучении крыс во всех исследуемых дозах (рис. 22 а, б). В последующие же сроки после облучения (72 ч) наблюдалось значительное понижение количества копий как вк-мтДНК, так и вк-яДНК в моче этих крыс. Зависимости количества вк-мтДНК и вк-яДНК от дозы облучения крыс описывались линейными функциями (рис. 22 в) [439].

На рисунке 23 показаны результаты количественного анализа содержания внеклеточной яДНК и мтДНК в образцах мочи крыс в разные сроки и дозы после внутрибрюшинного однократного введения блеомицина в дозах 3, 7 и 10 мг/кг. Результаты данных исследований показывают, что после внутрибрюшинного введения крысам блеомицина также происходит увеличение содержания фрагментов вк-мтДНК и вк-яДНК, однако менее выраженное по сравнению с экспериментами по облучению крыс [439].

Видно, что статистически значимое повышение содержания вк-ДНК в моче крыс происходит по мере нарастания дозы введенного блеомицина. Так, максимальное количество копий мтДНК и яДНК регистрировалось на 12-24-е часы после введения препарата. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс имеет линейную зависимость от дозы блеомицина (рис. 23 в). Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК выше по сравнению таковым вк-яДНК [439].

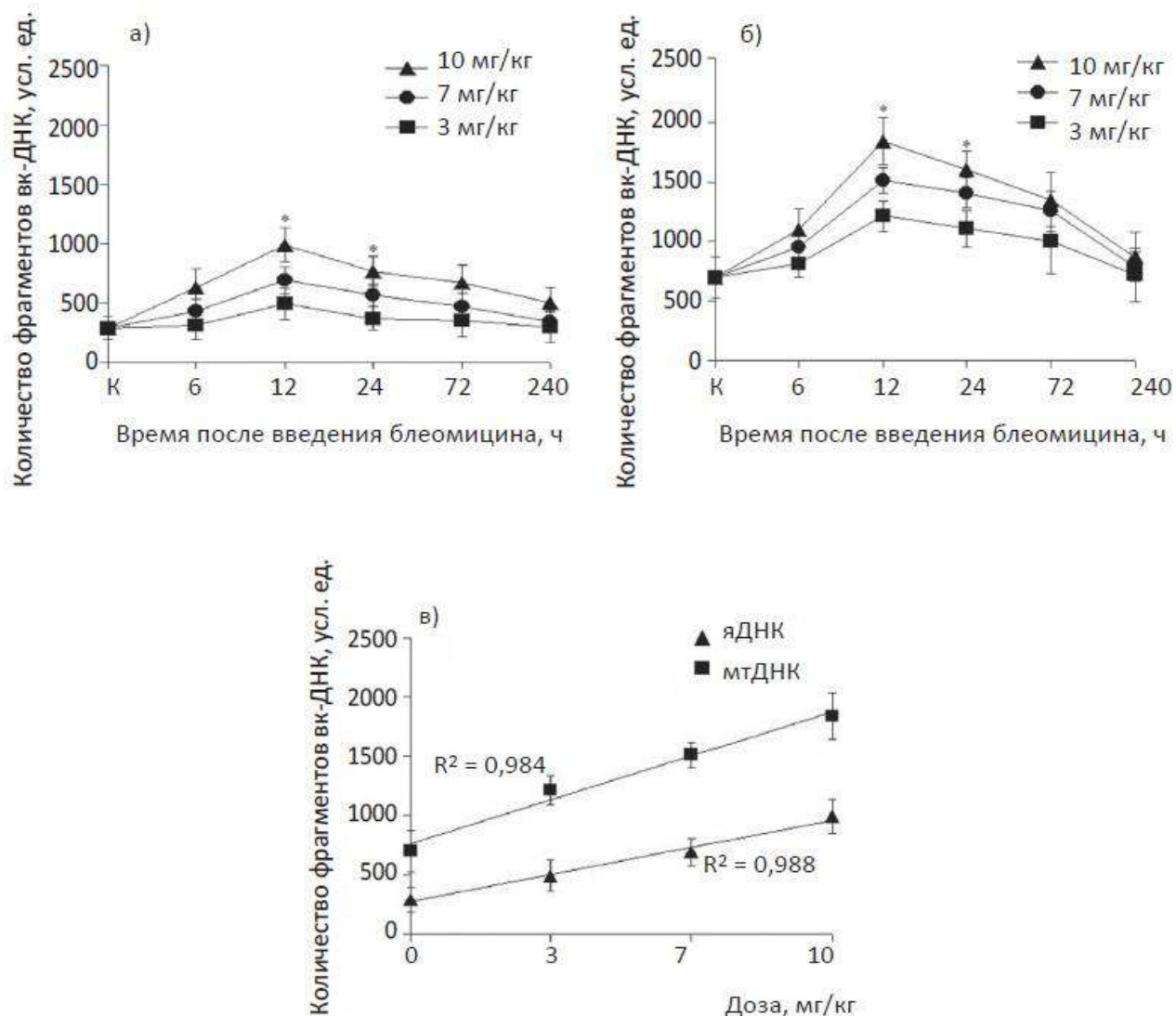


Рисунок 23 – Содержание фрагментов внеклеточной ДНК в моче крыс до и после введения блеомицина в дозах 3, 7 и 10 мг/кг. (а) – содержание фрагментов вк-яДНК; (б) – содержание фрагментов вк-мтДНК; (в) – содержание фрагментов вк-ДНК в зависимости от дозы введения блеомицина (12 часов); К – контроль (до введения препарата). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$.

Можно предполагать, этот результат обусловлен тем, что циркулирующая вк-мтДНК по сравнению с вк-яДНК больше подвержена деградации как в кровотоке,

так и после преодоления почечного барьера. Установлено, что циркулирующая вк-яДНК в плазме/сыворотке находится в составе нуклеосом, и, очевидно, больше защищена от нуклеазной деградации, в отличие от вк-мтДНК [296, 439]. Тем не менее, более повышенный уровень вк-мтДНК, по сравнению с вк-яДНК, сохраняется в моче крыс в течение довольно продолжительного пострадиационного времени, а также в группе животных после введения блеомицина. Поэтому увеличение количественного содержания вк-мтДНК в моче крыс после их обработки можно рассматривать как более чувствительный потенциальный биомаркер, характеризующий активацию клеточной гибели в тканях этих животных. Повышенный уровень вк-мтДНК по сравнению с вк-яДНК в моче крыс, наблюдаемый после облучения и введения блеомицина, возможно, обусловлен не только активацией апоптоза клеток [296, 392, 439], но и митофагией – селективным удалением поврежденных митохондрий, сопряженным с аутофагией [349, 393, 439].

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что количественные изменения вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс характеризуются линейной зависимостью от дозы рентгеновского облучения, а также от дозы химиотерапевтического препарата блеомицина. Данные исследования содержания циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в моче открывают новые возможности рассматривать их как потенциальные биомаркеры для неинвазивной оценки развития реакции организма на облучение и генотоксического действия средств химиотерапии опухолей [439].

3.5. Исследование радиопротекторных и радиомитигаторных эффектов мелатонина в тканях коры головного мозга и селезенки мышей при облучении

Структурные и функциональные нарушения в митохондриях, индуцируемые ИИ, оказывают влияние на пострадиационное развитие целого комплекса эффектов

на уровне клеток и целого организма. На основании данного факта, считаем возможным применять митохондриально-направленные комплексы для уменьшения негативного воздействия радиации, купирования разных последствий от облучения.

Многие ученые в последние десятилетия, были заняты разработкой новой методики, с помощью которой возможно уменьшить повреждения, которые наносит радиация. Данная методика базируется на применении митохондриально ориентированных антиоксидантов. Сегодня уже присутствует множество медикаментов, характеризующихся высокими радиопротекторными и радиомитигаторными качествами. Несколько ранее, бытовало мнение о том, радиопротекторы не обладают необходимой степенью результативности, но после проведенных исследований, было доказано, что они обладают способностью проникать через ткань мембран и оказываться внутри митохондрий, где начинают уменьшать окислительные процессы [335].

Вместе с этим, в наличии присутствуют такие комплексы, которые могут проходить через мембраны даже без связки с ТФФ. Мы говорим о мелатонине, характеризующимся довольно эффективным антиоксидантом, способным уменьшать воздействие разных негативных и токсичных аспектов, в том числе, и радиации. Данное вещество известно еще с древности в качестве антиоксиданта, с помощью которого ДНК надежно защищается от процесса окисления. На сегодняшний момент, мелатонин широко применяем в качестве средства, с адаптогенным свойством.

В данной работе также были изучены и такие процессы, как повреждение и восстановление структуры яДНК и мтДНК у подопытных животных, в частности, в тканях селезенки и головного мозга после того, как им был введен мелатонин в качестве радиопротектора до того, как животных подвергли облучению и в качестве радиомитигатора после того, как их облучили. Параллельно с этим, также рассматривали и воздействие мелатонина на степени преобразования ядер в костном мозге на клеточном уровне и на количество выживающих животных после того, как

их подвергали облучению. Ткани коры мозга и селезенки были взяты по их резкому различию в радиочувствительности (по критерию клеточной гибели) и по содержанию митохондрий и мтДНК (клетки мозга в 3 раза больше содержат мтДНК относительно клеток селезенки).

На рисунке 24 (в гистограммах) представлены результаты ПЦР-ПФ анализов по оценке наличия повреждений и репарации структуры яДНК (8.7 тыс. п.н.) и мтДНК (10.9 тыс. п.н.) тканей селезенки и коры головного мозга мышей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Здесь показаны также результаты ПЦР-ПФ анализов яДНК и мтДНК из этих же тканей мышей, которым вводили МЕЛ до облучения и после облучения (рис. 24).

Над гистограммами представлены образцы типичных электрофореграмм ПЦР-ПФ ампликонов яДНК и мтДНК, а также электрофореграммы продуктов амплификации контрольных коротких фрагментов яДНК (110 п.н.) и мтДНК (117 п.н.). Продукты амплификации длинных участков яДНК и мтДНК из тканей необлученных мышей приняты как контроль за 100%. Видно, что уровень синтезированных продуктов ПЦР-ПФ яДНК и мтДНК, из селезенки и коры мозга мышей через 15 мин после их облучения, значительно ниже по сравнению с таковым у необлученных мышей. Такое снижение продуктов ПЦР-ПФ указывают, что эти амплифицируемые участки яДНК и мтДНК содержат повреждения, способные блокировать ДНК-полимеразу быстрого запуска ПЦР КАРА Long Range («КАРА Biosystems», США). Дальнейшее сохранение низких уровней амплификации этих участков яДНК и мтДНК указывает на наличие в них не репарированных повреждений. Однако к 24 и 48 часам пострадиационного времени наблюдается увеличение продуктов ПЦР-ПФ, что указывает на функционирование процессов репарации структуры ДНК. Согласно полученным данным, в тканях мышей, получавших МЕЛ до и после облучения количество повреждений яДНК и мтДНК достоверно меньше. Это указывает, что МЕЛ способствует снижению повреждений ДНК.

Можно видеть, что репарация яДНК более активно происходит в тканях селезенки и коры мозга мышей, получавших МЕЛ после облучения (в режиме радиомитигатора).

При сравнении данных амплификации ПЦР-ПФ яДНК, облученных и получавших МЕЛ, видно, что в ткани селезенки в указанные сроки пострadiационного времени процесс репарации яДНК протекает более активно, чем в коре мозга. На основе результатов эксперимента, можно заключить, что мтДНК в селезенке и коре мозга восстанавливается активно, особенно у мышей, получивших МЕЛ после облучения. Однако, если увеличение синтеза продукта ПЦР-ПФ яДНК в течение постлучевого периода обусловлено репарацией повреждений яДНК, которые ингибируют KAPA Long Range ДНК-полимеразу, то вряд ли это будет причиной резкого увеличения синтеза продуктов ПЦР-ПФ мтДНК из тех же тканей мышей.

Известно, что в митохондриях млекопитающих эффективно функционирует только эксцизионная репарация оснований ДНК [394]. Другие пути репарации повреждений ДНК не функционируют в митохондриях млекопитающих. Более того, двунитевые разрывы (ДР) мтДНК в клетках млекопитающих не репарируются [395, 396], и мтДНК с возникновением ДР может подвергаться деградации [397]. Поэтому, скорее всего, мы в данном эксперименте регистрируем активацию биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК.

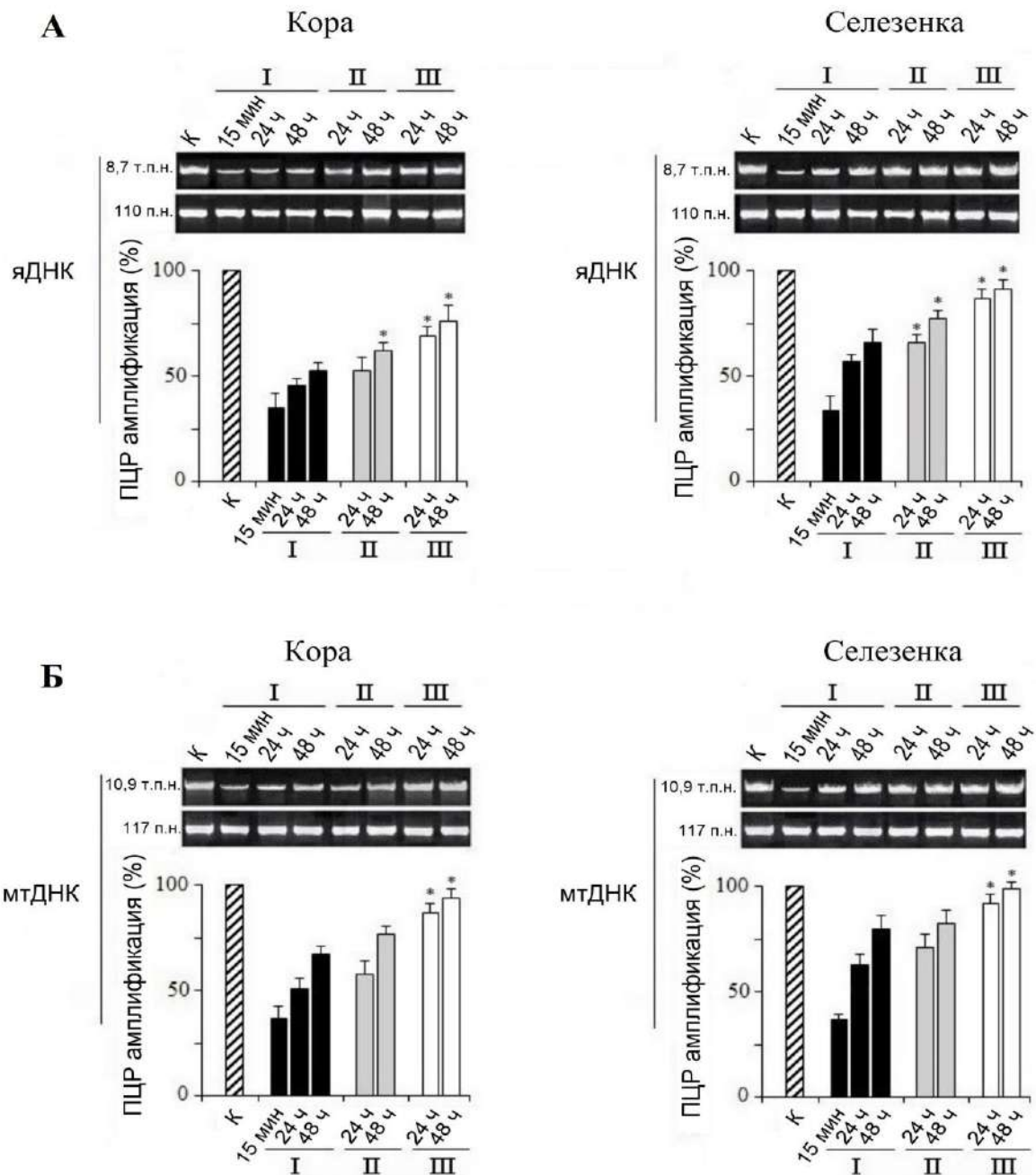


Рисунок 24 – Анализ повреждений и репарации яДНК и восстановление мтДНК. Амплифицировали длинные фрагменты яДНК (8,7 тыс. п.н.) и мтДНК (10,9 тыс. п.н.). Эти данные были нормализованы к коротким фрагментам яДНК (110 п.н.) и мтДНК (117 п.н.), полученными с использованием того же образца ДНК. (А) – Количественный анализ ампликонов ПЦР-ПФ яДНК ткани коры головного мозга и

селезенки. (Б) – Количественный анализ ампликонов ПЦР-ПФ мтДНК ткани коры головного мозга и селезенки. Данные представлены в % от контроля (К). Здесь и на других рисунках: доза рентгеновского облучения мышей составляла 5 Гр, мышам вводили МЕЛ до и после облучения в однократной дозе 125 мг/кг. Цифры (15 мин, 24 часов, 48 часов) сверху и снизу обозначают время после облучения. I – мыши без введения МЕЛ; II – введение МЕЛ до облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$.

Для проверки этого предположения, были продолжены эксперименты по выяснению влияния МЕЛ на количественное содержание мтДНК относительно яДНК в тканях селезенки и коры мозга мышей, подвергнутых радиационному воздействию. Изменение числа копий мтДНК или соотношения мтДНК/яДНК является важнейшим критерием оценки митохондриального биогенеза в тканях или клетках [398, 399]. Результаты анализов, полученные методом ПЦР в реальном времени, показывают, что количества копий мтДНК увеличиваются в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 24 и 48 часов после их облучения в дозе 5 Гр, по сравнению с данными группы контрольных (необлученных) животных (рис. 25). Судя по количеству копий мтДНК, усиление синтеза мтДНК более выражено в ткани селезенки, чем в коре мозга облученных мышей. Эти результаты подтверждают высказанное предположение о возможности активации биогенеза митохондрий с синтезом мтДНК в тканях облученных мышей. Вместе с тем, видно, что при введении МЕЛ синтез молекул мтДНК происходит менее активно, по сравнению с данными, полученными у облученных мышей без введения МЕЛ (рис. 25). По-видимому, МЕЛ частично подавляет индуцируемый ИИ синтез мтДНК в тканях коры головного мозга и селезенки. При этом эффект подавления, индуцированного ИИ синтеза мтДНК при введении МЕЛ животным после их

облучения более выражен по сравнению с данными группы мышей, которым вводили МЕЛ до облучения.

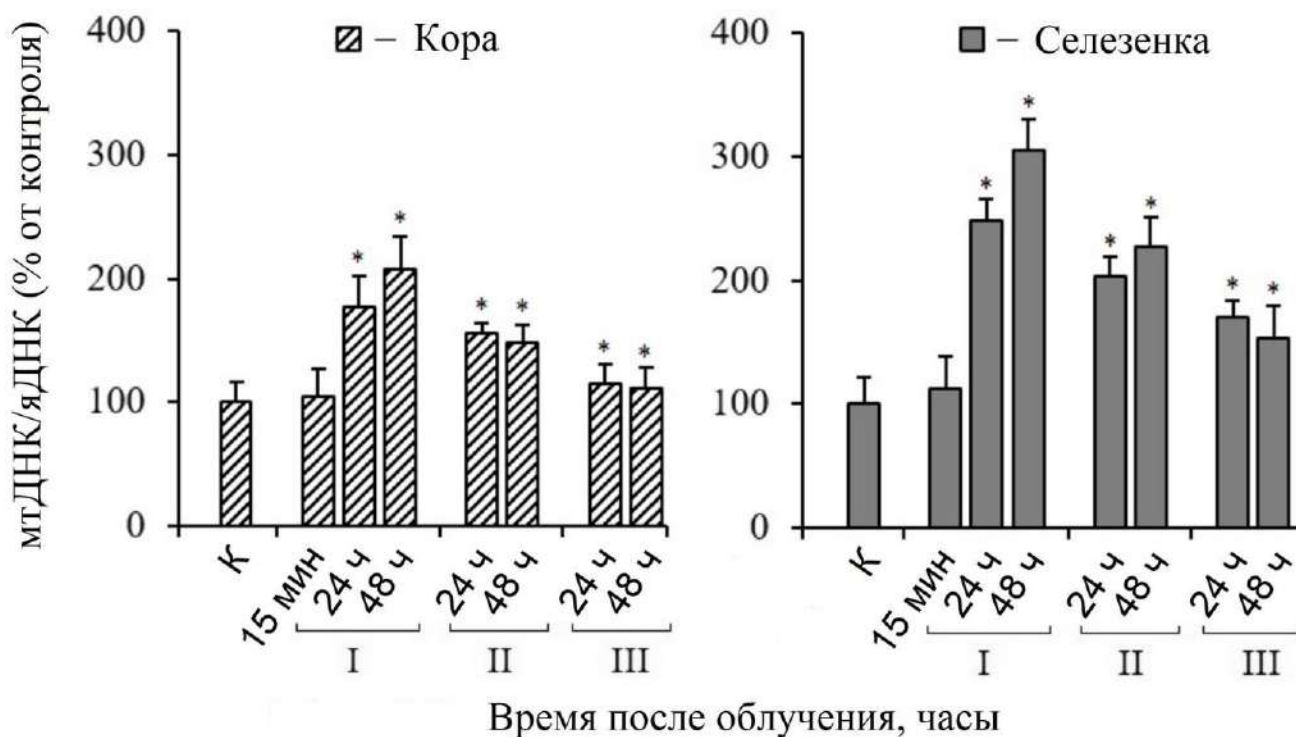


Рисунок 25 – Содержание фрагментов мтДНК (ген *ND4*), относительно яДНК (ген *GAPDH*) в тканях коры головного мозга и селезенки мышей, облученных в дозе 5 Гр. Цифры (15 мин, 24 часов, 48 часов) обозначают время после облучения. I – мыши без введения МЕЛ; II – введение МЕЛ до облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что при инициации репликативного синтеза, с вовлечением поврежденных мтДНК-матриц, с участием ДНК-полимеразы γ и ДНК-полимеразы- θ в митохондриях [400, 401] можно ожидать

появление новых копий мтДНК с мутациями и делециями в тканях мышей, после их облучения ИИ.

На рисунке 26А показаны электрофореграммы продуктов расщепления “Surveyor” нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК из тканей селезенки и коры мозга, контрольных и облученных мышей.

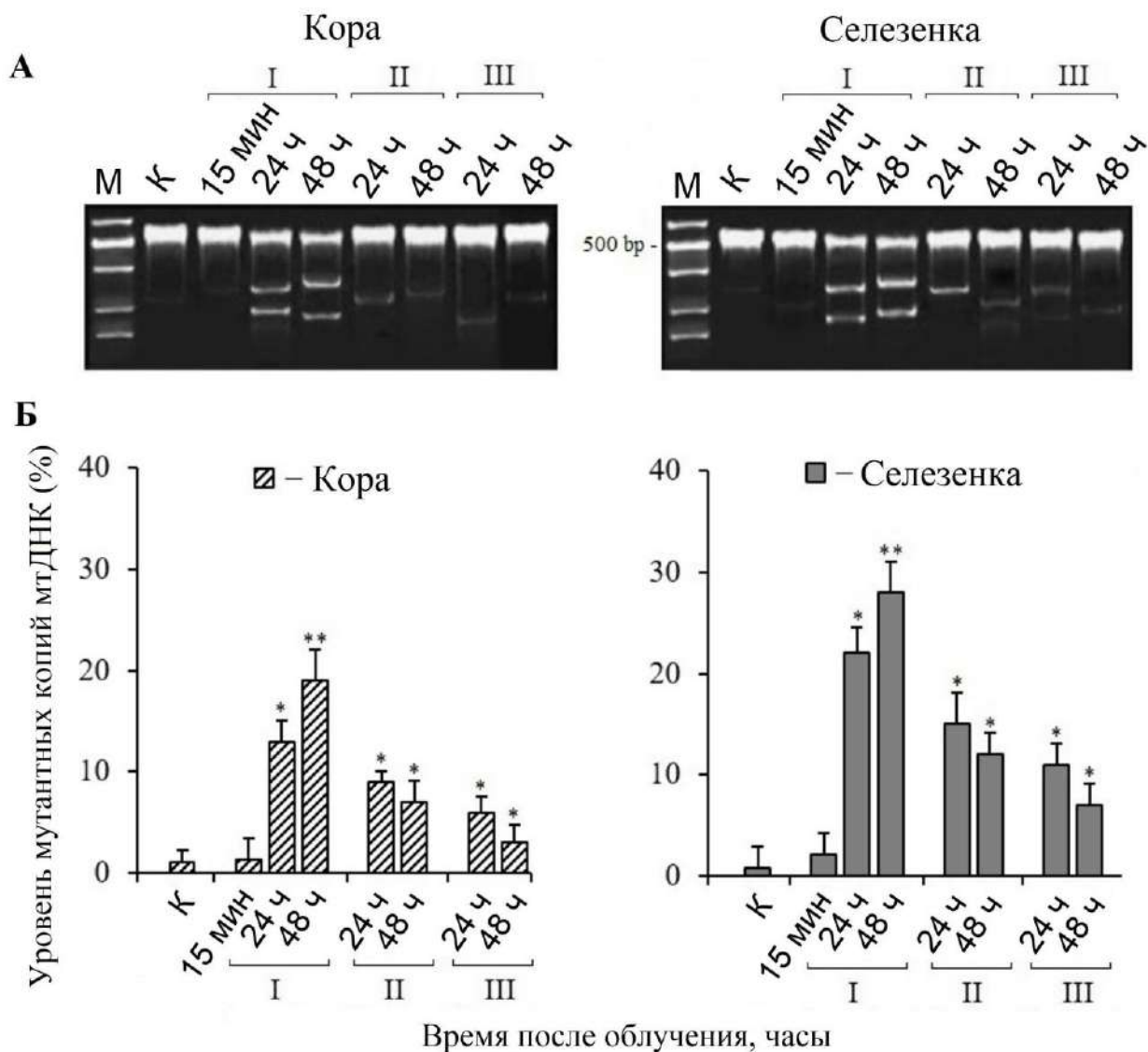


Рисунок 26 – Анализ мутантных копий мтДНК в тканях коры головного мозга и селезенки у мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. (А) Электрофореграммы продуктов расщепления “Surveyor”

нуклеазой гетеродуплексов ПЦР-ампликонов мтДНК (ген *ND3*, 534 п.н.). (Б)

Процент расщепления нуклеазой гетеродуплексов. I – мыши без введения МЕЛ; II – введение МЕЛ до облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов.

Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Количественный анализ продуктов расщепления гетеродуплексов показал, что в тканях селезенки и коры мозга мышей значительно увеличивается уровень мутантных копий мтДНК в течение 24-48 часов после облучения (рис. 26 Б). Так, количество мутантных копий в ткани коры мозга к 48 часам пострadiaционного времени возрастает до 20%, а в ткани селезенки до 30%, относительно контроля. С другой стороны, в тканях мышей, получавших МЕЛ до облучения и после облучения, данные по результатам анализов количества мутантных копий мтДНК существенно меньше по сравнению с таковыми результатами от мышей, не получивших МЕЛ. Следует также отметить, что значительное снижение количества мутантных копий мтДНК регистрируется в ткани коры головного мозга при введении МЕЛ мышам после их облучения, по сравнению с данными, полученными в селезенке облученных мышей, получавших МЕЛ. Таким образом, показано, что в процессе пострadiaционного биогенеза митохондрий часть синтезированных молекул мтДНК являются мутантными копиями (рис. 26).

На рисунке 27 можно видеть, что активность продукции перекиси водорода (H_2O_2) более резко возрастает в ткани селезенки облученных мышей в течение 24-48 часов пострadiaционного периода. Вместе с тем, при введении МЕЛ существенно снижается уровень H_2O_2 в селезенке. В ткани коры мозга тенденция изменения содержания пероксида водорода такая же, как в селезенке, но менее выражена. Можно видеть, что после облучения мышей происходит повышение уровня H_2O_2 через 15 минут в ткани мозга и этот уровень сохраняется в течение 24 и 48 часов.

Вместе с тем, наблюдалось снижение уровня пероксида водорода в ткани коры мозга мышей, которым вводили МЕЛ, только к 48 часам после облучения.

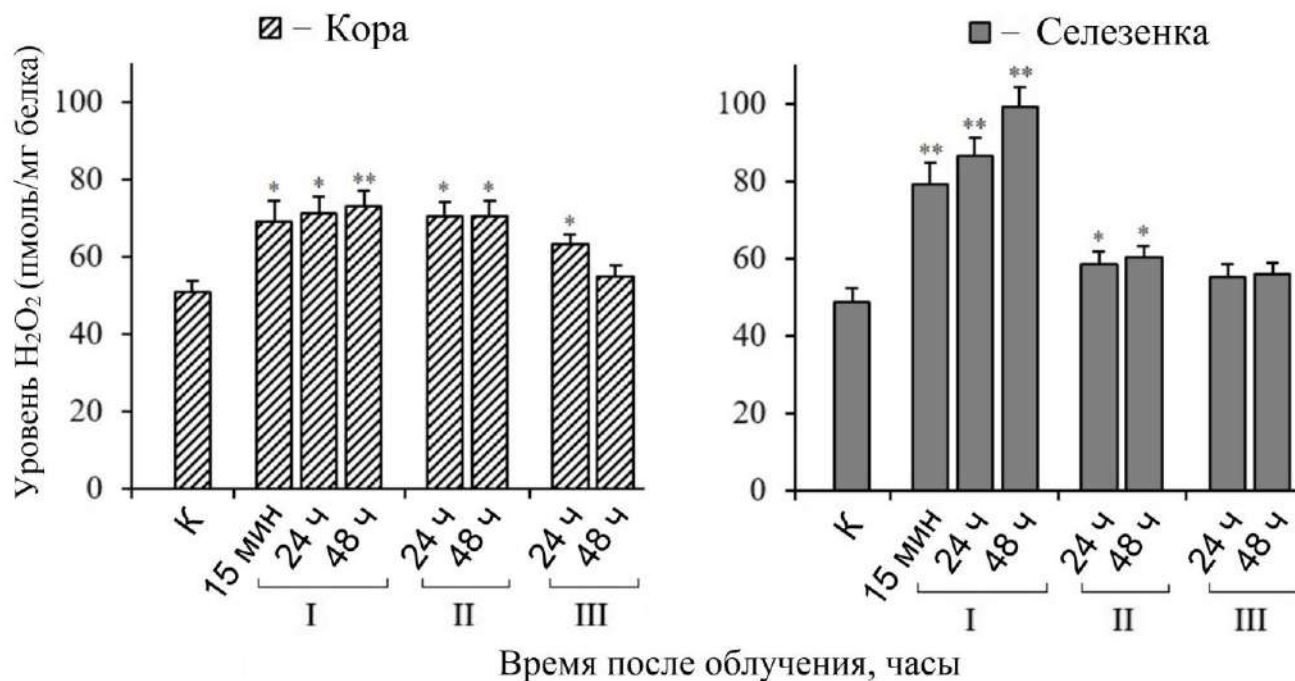


Рисунок 27 – Изменение содержания H_2O_2 в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения МЕЛ; II – введение МЕЛ до облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm SEM$ от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

На рисунке 28 представлены результаты анализа содержания АТФ в тканях селезенки и коры мозга контрольных и облученных мышей. Полученные данные показывают, что в ткани селезенки примерно в два раза меньше содержание АТФ на единицу веса ткани, по сравнению с ее содержанием в ткани коры мозга. Наблюдаемая разница, по всей видимости, обусловлена неодинаковым содержанием

митохондрий в этих тканях. Тем не менее пострadiaционные изменения содержания АТФ в обеих тканях сравнительно близки. Видно, что в начальный период после облучения, особенно через 15 мин, резко снижается содержание АТФ в обеих тканях. Однако, через 24 и 48 часов пострadiaционного времени мы наблюдаем тенденцию к восстановлению содержания АТФ в обеих тканях облученных мышей. Более того, восстановление содержания АТФ в тканях мышей, получивших МЕЛ до облучения и после облучения, происходит более активно. Это лучше всего видно по результатам, полученным на тканях коры мозга. Таким образом, можно заключить, что МЕЛ способствует поддержке функции митохондрий и синтеза необходимого уровня АТФ в тканях селезенки и коры мозга облученных мышей.

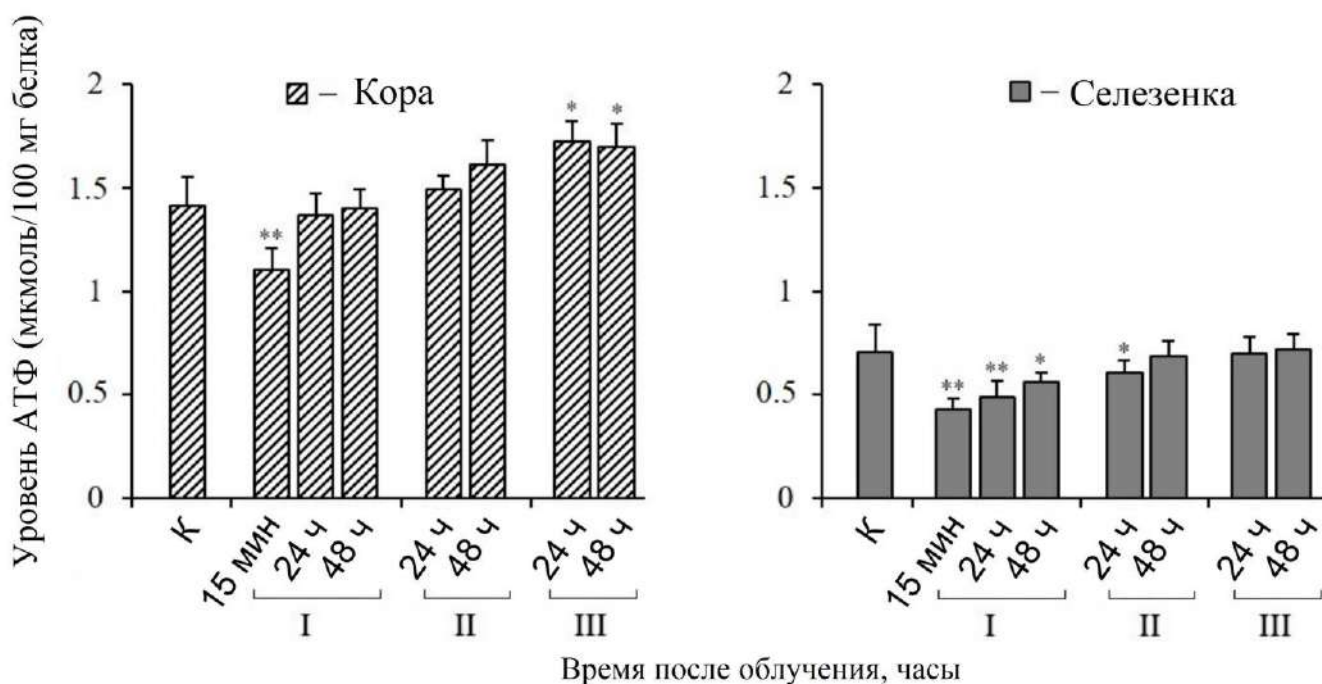


Рисунок 28 – Изменение уровня АТФ в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения МЕЛ; II – введение МЕЛ до облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее

значение $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

На рисунке 29 представлены результаты анализа изменения продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) в тканях коры мозга и селезенки мышей, подвергнутых воздействию рентгеновского излучения. Эти результаты показывают, что в ткани селезенки через 15 минут и через двое суток после облучения наблюдается резкое повышение МДА. Введение мышам до их облучения и после облучения МЕЛ способствует существенному снижению МДА в ткани селезенки.

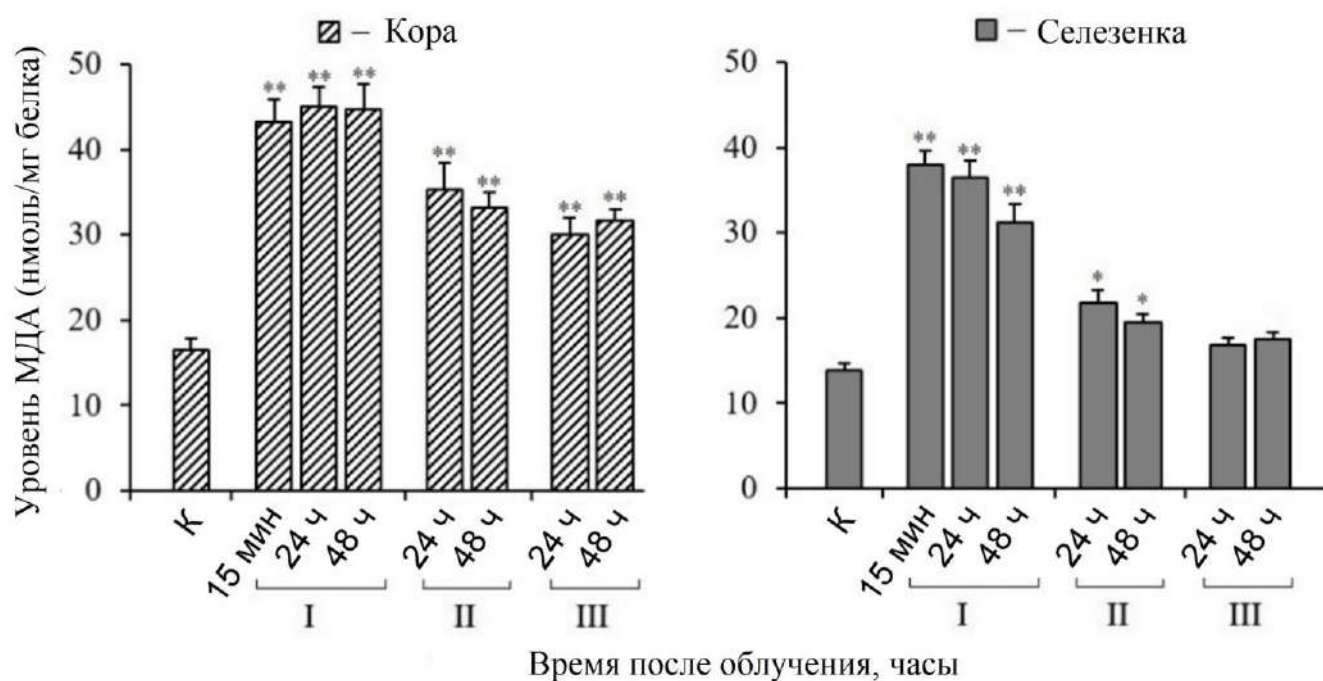


Рисунок 29 – Изменение уровня МДА в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения МЕЛ; II – введение МЕЛ до

облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Аналогичные результаты были в анализах МДА в ткани коры мозга этих же мышей. Однако результаты анализов в ткани мозга количественно отличаются от данных по анализам ткани селезенки. Прежде всего, в ткани коры мозга уровень МДА выше, по сравнению с данными анализов селезенки. Кроме того, введение МЕЛ мышам до облучения и после облучения в ткани мозга сохраняется повышенное содержание МДА, хотя существенно меньше относительно данных анализов в тканях мышей, которым не вводили МЕЛ.

Можно отметить также, что данные, полученные по анализам МДА как в ткани селезенки, так и в ткани коры мозга облученных мышей, которым вводили МЕЛ после их облучения ниже результатов, полученных в тканях мышей, получавших МЕЛ до облучения.

Восстановленный глутатион (ГЛТ) важнейший неферментативный антиоксидант, который играет значительную роль в определении радиочувствительности клеток. Результаты анализов показывают, что в тканях селезенки и коры мозга мышей после воздействия рентгеновского излучения происходит резкое снижение глутатиона (рис. 30).

Эти данные показывают также, что содержание глутатиона в селезенке более чем два раза ниже по сравнению с таковым в ткани коры мозга. Вместе с тем, в обеих тканях в течение пострадиационного времени (до 48 часов) сохраняется пониженные содержания глутатиона. Только при введении МЕЛ мышам до облучения или после облучения, можно было наблюдать активное повышение содержания глутатиона в тканях этих мышей. При этом результаты показывают, что

в ткани коры мозга восстановление содержания глутатиона происходит более активно у мышей, которым вводили МЕЛ после облучения.

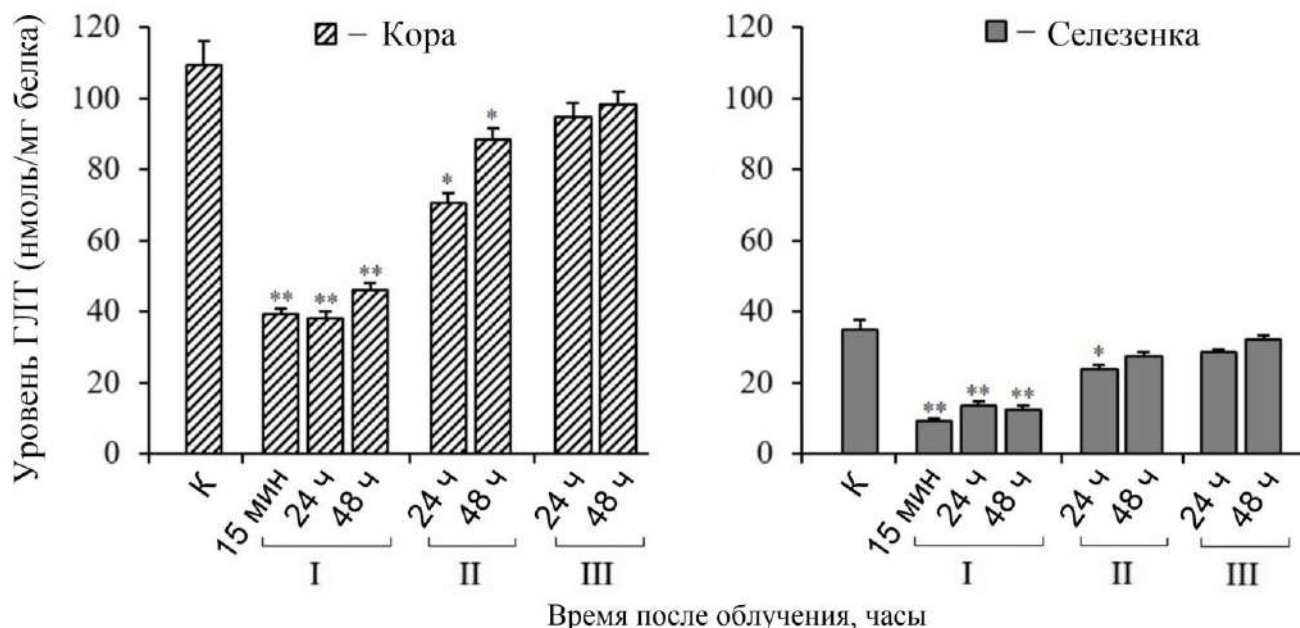


Рисунок 30 – Изменение уровня глутатиона (ГЛТ) в тканях коры головного мозга и селезенки мышей через 15 мин, 24 и 48 часов после воздействия рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. I – мыши без введения мелатонина (МЕЛ); II – введение МЕЛ до облучения; III – введение МЕЛ после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM от 5-6 независимых экспериментов. Статистическая значимость была установлена на уровне * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Таким образом, данные анализов показывают, что в облученных клетках и по этим маркерам также реализуется радиопротекторный и радиомитигаторный потенциал МЕЛ, как результат повышения уровня антиоксидантной активности в клетках. Это согласуется с сообщениями о резком снижении антиоксидантной активности в крови мышей в течение 50 дней после их облучения [402, 403].

Радиационное повреждение селезенки в определенной степени связано также с проявлением гематологической токсичности и оказывает влияние на состояние

клеток костного мозга [404, 405, 435]. Много лет используется микроядерный тест как один из популярных методов, генотоксической оценки действия ИИ *in vitro* и *in vivo*. Формирование МЯ в облученных делящихся клетках принято рассматривать как результат разрыва хромосом или следствие ошибок аппарата деления клеточного ядра [405]. Результаты анализов МЯ в клетках костного мозга мышей представлены на рисунке 31.

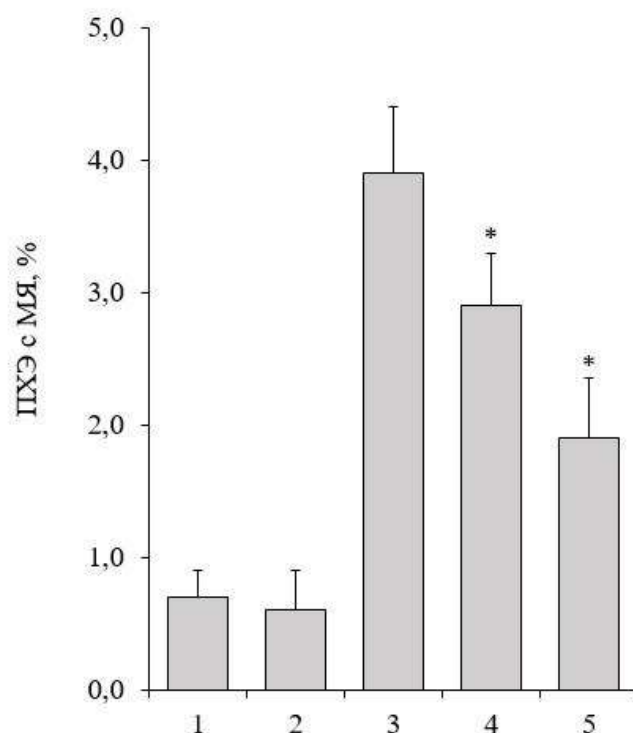


Рисунок 31 – Частота образования микроядер в полихроматических эритроцитах костного мозга мышей после воздействия рентгеновского излучения в дозе 2 Гр. 1 – контроль (необлученная группа); 2 – после введения МЕЛ; 3 – облученные; 4 – МЕЛ (за 30 мин до облучения) + облучение; 5 – облучение + МЕЛ (20 мин после облучения); Анализы проводили через 24 часа после облучения. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM из 5-6 независимых

экспериментов. Уровень достоверной статистической значимости различий был установлен на уровне $p < 0.05$ (*).

При введении МЕЛ мышам до их облучения частота микроядер снижалось на 30%, а при введении после облучения - на 70% относительно мышей, облученных без введения препарата [435]. Результаты согласуются с данными, полученными на лимфоцитах крови человека *in vitro*, обработанных МЕЛ после облучения [406]. При введении МЕЛ мышам до их облучения частота микроядер значительно снижалось относительно мышей, облученных без введения препарата [435]. В работе Rostami и соавторов было показано, что МЕЛ отдельно и в сочетании с витамином С также резко снижает частоту микроядер в лимфоцитах человека, индуцируемых ИИ [407].

Важнейшим оценочным критерием радиопротекторного и радиомитигаторного действия МЕЛ на мышей являлась также регистрация пострadiaционного выживания при введении препарата до и после облучения в дозах 5 и 9 Гр [435].

Результаты экспериментов сравнительной оценки радиопротекторного и радиомитигаторного действия МЕЛ на мышей представлены на рисунке 32 в виде кривых выживаемости [435].

Полученные результаты показывают, что в группе контрольных облученных в дозе 5 Гр (без введения МЕЛ) мышей приблизительно 25% животных оставались живыми в течение 30 суток. В группе контрольных облученных мышей в дозе 9 Гр (без введения МЕЛ) наблюдалась 100%-я гибель животных на 11-е сутки. Однако при обеих дозах облучения мышей с введением МЕЛ наблюдался радиозащитный эффект. В случае при введении МЕЛ до облучения в дозах 5 Гр и 9 Гр наблюдался меньший радиозащитный эффект, т.е. в живых оставались 45% и 20% животных, соответственно. В случае при введении МЕЛ через 20 минут после облучения (с дополнительным введением МЕЛ в питьевую воду 0,3 мг/мл в течение 5 суток пострadiaционного времени) получен другой результат. При этом с введением МЕЛ

при облучении в дозах 5 Гр и 9 Гр на 30 сутки остались в живых 80% и 50% животных, соответственно [435].

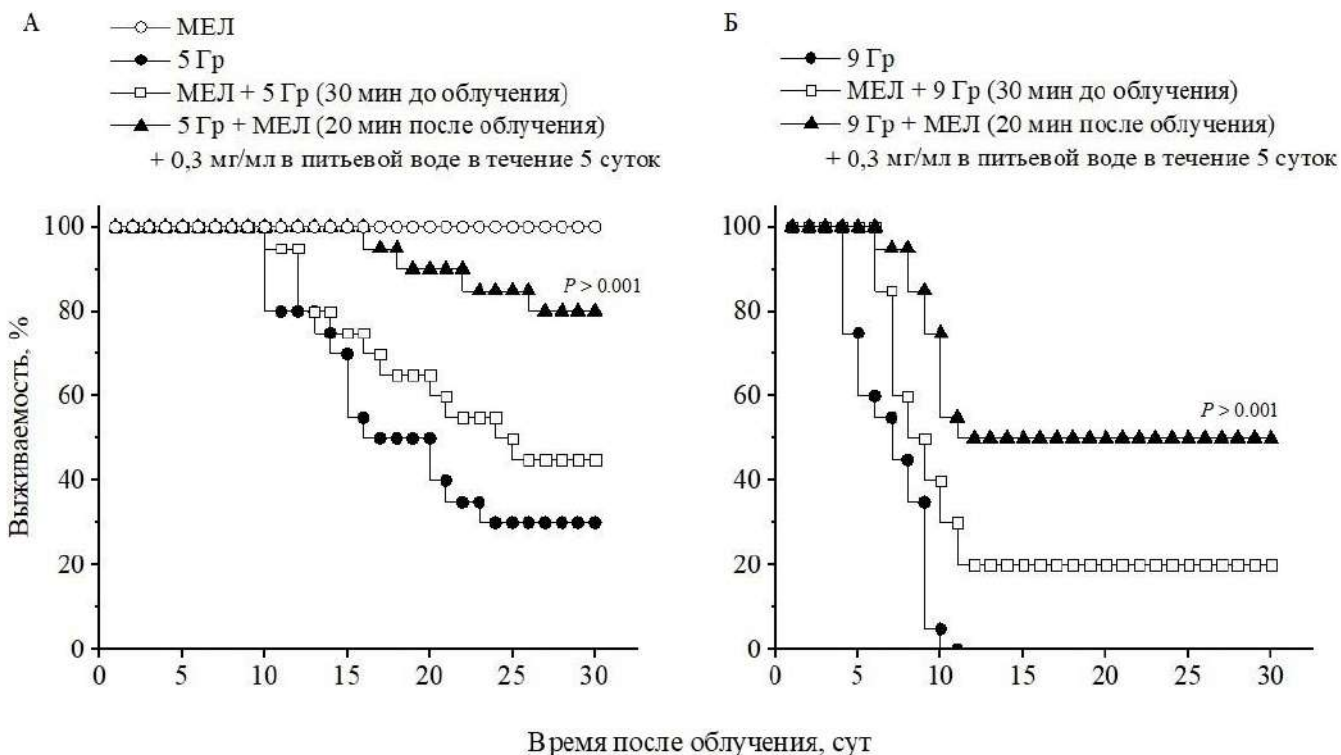


Рисунок 32 – Кривые выживаемости мышей ($n=30$) при введении МЕЛ (125 мг/кг) за 30 минут до и через 20 минут после воздействия рентгеновского излучения (с дополнительным введением МЕЛ 0,3 мг/мл в питьевой воде в течение 5 дней) в дозах 5 Гр (А) и 9 Гр (Б). Выживание животных наблюдали в течение 30 дней после облучения.

Таким образом, МЕЛ способен снижать пострadiaционный гибель животных при его введении не только до их облучения, но и в режиме после радиационного воздействия [434, 435]. Ранее во многих публикациях было продемонстрировано радиозащитный эффект МЕЛ при его введении животным до облучения [406, 408-410]. Результаты нашего исследования показали, что последствия лучевой реакции

можно снизить и путем введения МЕЛ после радиационного воздействия [434, 435]. Это положение согласуется также с данными исследования Amini и соавторов, которые показали, что эффект радиомитигаторного действия МЕЛ удастся достичь даже при его введении мышам через 24 часа после их облучения [408]. Авторы показали, что введением МЕЛ мышам через 24 часа после их облучения удастся снизить повреждение гемопоэтической системы, а также достичь повышения выживаемости этих мышей.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что мелатонин является достаточно активным радиомитигатором, снижающим, прежде всего, митохондриальную дисфункцию (соответственно – пролонгированный окислительный стресс), индуцируемую ионизирующим излучением [434, 435]. Хотя ранее было показано, что мелатонин является эффективным антиоксидантом и радиопротектором, защитником ДНК [336], он не получил рекомендации для клинического использования как радиопротектор, поскольку оказывает нежелательный снотворный эффект у спец. персонала. Полученные нами результаты и литературные данные указывают на необходимость использования мелатонина в качестве радиомитигатора и адъюванта при радиотерапии рака, исключительно после радиационной обработки опухолей. Мелатонин синтезируется в митохондриях и является митохондриально нацеленным антиоксидантом [434, 435].

Таким образом, мощный радиозащитный эффект мелатонина, низкая токсичность, способность подавлять митохондриальную дисфункцию, способность проникать в митохондрии различных типов клеток - является важной характеристикой данного соединения для его использования в качестве средства, снижающего повреждение нормальных близлежащих тканей при проведении радиотерапии опухолей [434, 435].

3.6. Исследование влияния метформина на пострadiaционную выживаемость мышей, образование микроядер в клетках костного мозга и экскрецию вк-мтДНК и вк-яДНК в моче облученных крыс

Наличие циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в биологических жидкостях животных и человека принято рассматривать как результат постоянно реализуемой клеточной гибели в их тканях. Различные модуляторы клеточной гибели также позволяют оценивать их действия по изменению содержания вк-ДНК в биологических жидкостях животных и человека. К одним из таких модуляторов относится N, N'-диметилбигуанидин - метформин (МФ), который является пероральным гипогликемическим агентом, широко используемым в терапии сахарного диабета 2-типа [343]. Известно, что МФ является активатором 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) [358-360]. АМФК является полисубъединичным (гетеротримерным) комплексом – главным регулятором клеточного и системного энергетического гомеостаза. Активированная АМФК вызывает каскад внутриклеточных событий, прежде всего, усиление биогенеза митохондрий, аутофагии, и стимулирует производство энергии. Несмотря на то, что молекулярные механизмы действия МФ остаются до конца неизученными, известно, что это лекарство снижает частоту возникновения онкогенеза у людей, и увеличивает продолжительность жизни у грызунов [344]. МФ также способствует повышению эффективности радиотерапии опухолей при его комбинированном применении [345, 346]. МФ стимулирует митофагию поврежденных или нефункциональных органелл, обеспечивая восстановление здоровой популяции митохондрий в клетках [363, 364].

Поэтому, в данной работе мы исследовали влияния МФ на выживаемость мышей и на частоту микроядер (МЯ) в клетках их костного мозга и на экскрецию внеклеточной ядерной ДНК (вк-яДНК) и внеклеточной митохондриальной ДНК (вк-мтДНК) с мочой крыс, облученных рентгеновскими лучами.

На рисунке 31 представлены результаты определения пострадиационной выживаемости мышей, облученных рентгеновскими лучами в летальной дозе (8 Гр).

Эти данные показывают, что в группе контрольных мышей, которые получали питьевую воду, средняя продолжительность жизни составила 6 суток, а максимальное время дожития 11 суток.

Аналогичный результат, т.е. отсутствие радиопротекторного эффекта, мы видим по данным пострадиационной гибели мышей группы, получавших МФ за 25 мин до их облучения.

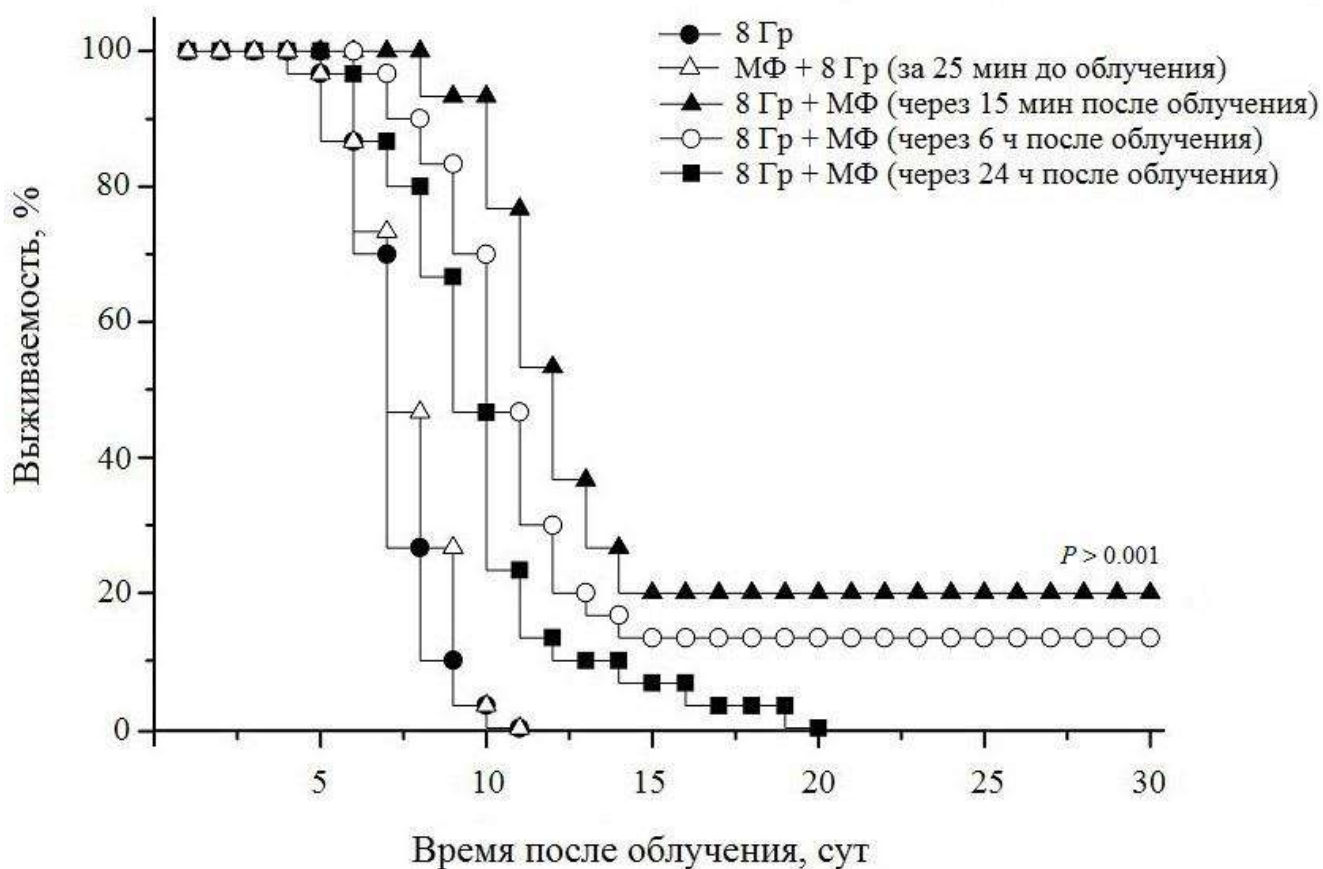


Рисунок 31 – Влияние МФ на выживаемость мышей при введении за 25 мин до и в разное время после воздействия рентгеновского излучения в дозе 8 Гр. Каждая экспериментальная группа состояла из 30 мышей.

Однако, при введении МФ мышам через 15 мин и через 6, 24 часа после их облучения, мы регистрируем существенное повышение выживаемости этих животных. Наибольшую выживаемость мы наблюдаем в группе мышей, получавших МФ через 15 мин после их облучения в летальной дозе. Так, на 11-й день после облучения (8 Гр) мы наблюдаем 100% смертность в контрольной группе мышей, в то время как в группе мышей, которым вводили МФ после облучения, мы видим, что 78% мышей остаются в живых. 20% мышей выжили в этой группе на 30 день после их облучения. Вместе с тем, как показывают полученные данные, задержка во времени до 6 и 24 часов с введением МФ мышам после их облучения, приводит к снижению защитного эффекта этого препарата (рис. 31).

Анализ МЯ в клетках костного мозга мышей, которым вводили МФ до и после их облучения рентгеновскими лучами показал сравнимые с их выживаемостью результаты (рис. 32). Эти данные свидетельствуют о том, что существенно низкий уровень доли ПХЭ костного мозга с МЯ, регистрируется при введении метформина через 15 мин и через 6 часов после облучения животных (в 2 и 1,5 раза, соответственно).

При введении МФ мышам за 25 мин до их облучения и через 24 часа после облучения не выявлены достоверные различия частот ПХЭ с МЯ по сравнению с показателями мышей, облученных без введения МФ. Эти данные, как и результаты по определению выживаемости облученных мышей, указывают, что МФ действует как пострадиационный митигаторный эффектор.

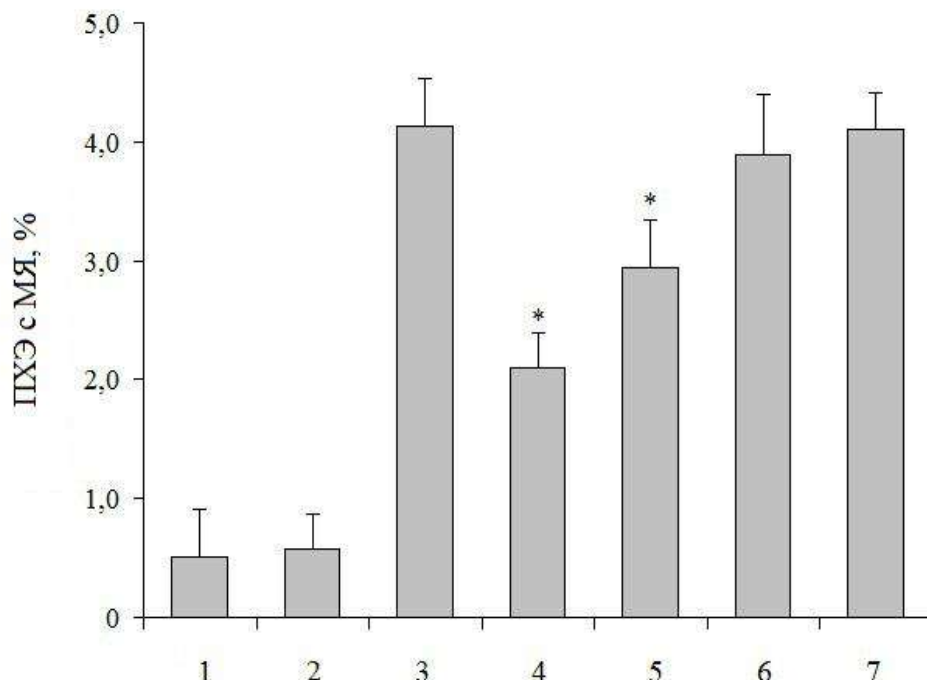


Рисунок 32 – Образование микроядер (МЯ) в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) костного мозга облученных мышей при введении МФ. 1 – контроль; 2 – после введения МФ; 3 – 2 Гр; 4 – 2 Гр + МФ через 15 мин после облучения; 5 – 2 Гр + МФ через 6 часов после облучения; 6 – 2 Гр + МФ через 24 часа после облучения; 7 – МФ за 25 минут до облучения + 2 Гр. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM (n=8). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$.

На рисунке 33 представлены анализы по выяснению изменения содержания вк-ДНК в моче у необлученных крыс в разные сроки после введения им МФ. Видно, что МФ вызывает увеличение содержания вк-ДНК в моче крыс. Этот повышенный уровень более выражен для вк-мтДНК и сохраняется в течение 12 часов после введения МФ. Статистически достоверное повышение вк-яДНК регистрируется только к первому сроку (6 часам) анализов после введения МФ. Таким образом, введение МФ здоровым (необлученным) крысам способствует повышенной экскреции вк-ДНК с их мочой.

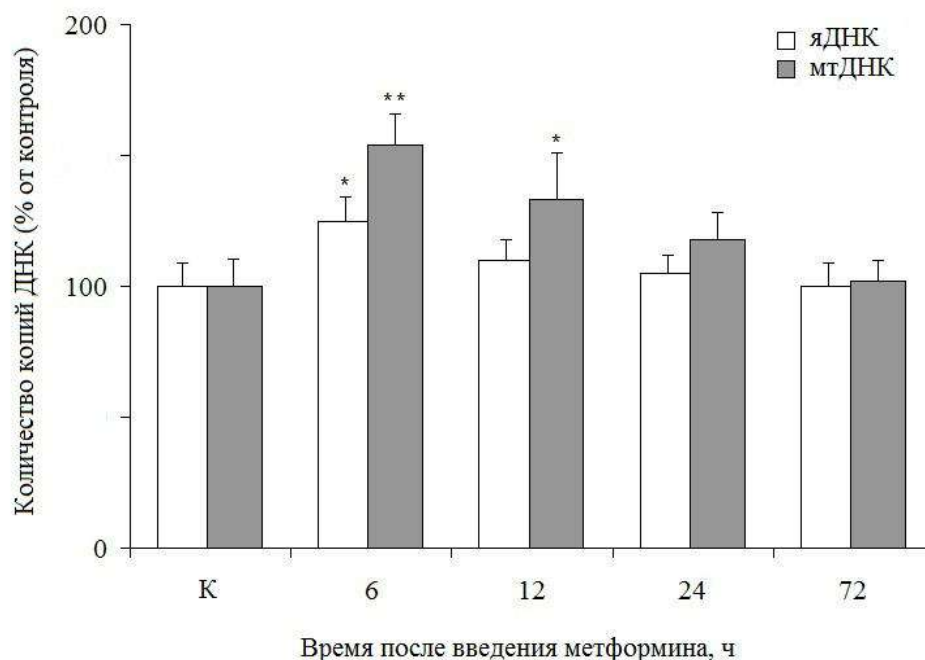


Рисунок 33 – Содержание вк-ДНК выделенной из образцов мочи необлученных крыс, собранных до введения МФ и через 6, 12, 24 и 72 часа после введения МФ, (100%, контроль – К, до введения МФ). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM ($n = 8$). Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Результаты анализов содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс, собранные (через 6, 12, 24, 72 ч) после их облучения и введения МФ (сразу после облучения), представлены на рисунке 34.

Эти данные показывают, что содержание фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче облученных крыс значительно повышается в зависимости от времени сбора мочи после облучения и введения метформина. Повышенный уровень содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс сохраняется в течение 6, 12, 24 часов после их облучения и введения метформина. Однако к 72 ч после облучения и введения МФ наблюдается снижение содержание вк-ДНК в моче этих крыс до уровня их

содержания в образцах мочи контрольных животных. Через 6 и 12 часов после облучения крыс на фоне введения МФ содержание вк-яДНК в моче увеличивается на 290-300%, а содержание вк-мтДНК на 430-530% (относительно контроля – данных, полученных у тех же крыс до облучения и введения метформина). После облучения крыс без введения метформина в моче мы регистрируем менее выраженное увеличение содержания вк-яДНК 180-200% и вк-мтДНК на 350-400% соответственно. Больше всего, в этих анализах, мы выявляем увеличение фрагментов вк-мтДНК в моче облученных крыс, получавших метформин (рис. 34).

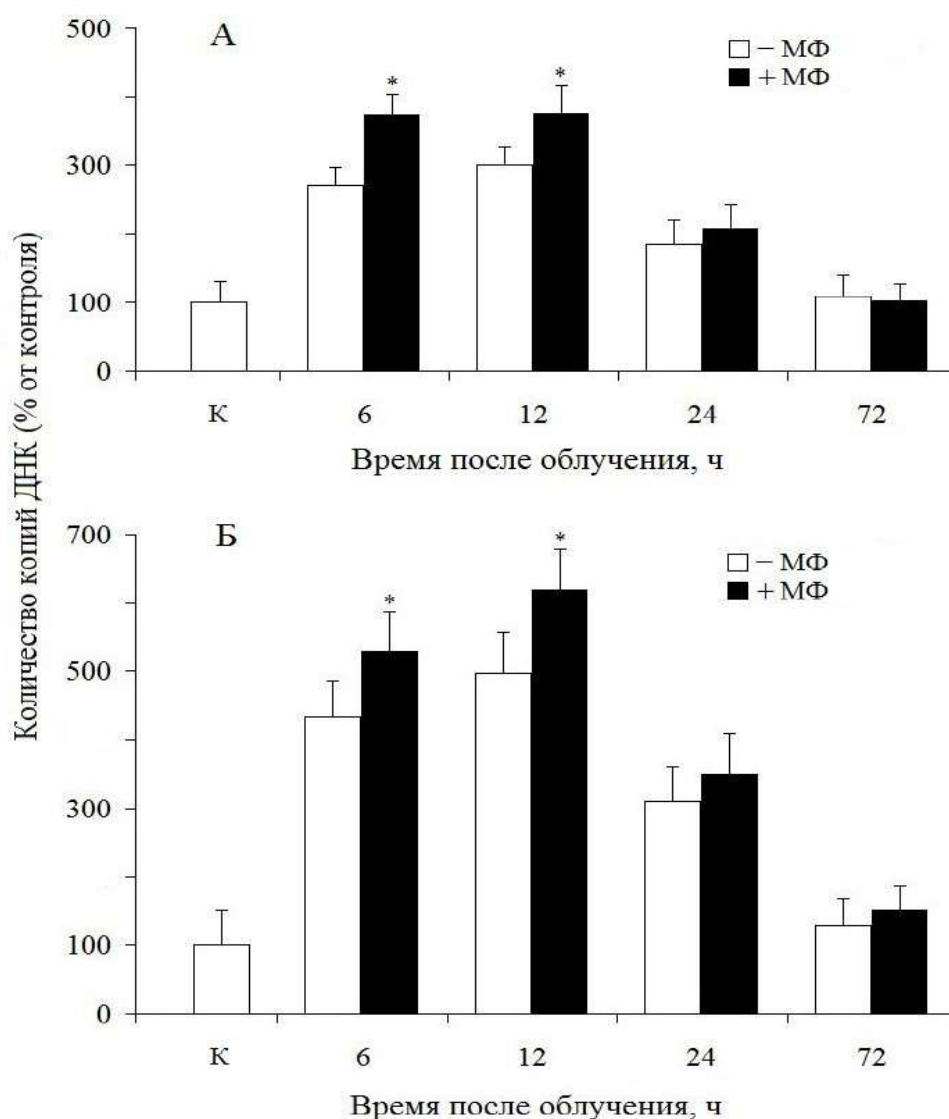


Рисунок 34 – Количество вк-ДНК в моче крыс при введении МФ сразу после облучения (время сбора мочи через 6, 12, 24 и 72 часа после введения МФ). (А) – вк-

яДНК; (Б) – вк-мтДНК. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM (n = 8).

Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$.

На рисунке 35 представлены анализы определения содержания вк-ДНК в моче крыс, получавших метформин через 24 часа после их облучения. Видно, что после введения метформина животным через 24 часа после их облучения также происходит увеличение в моче содержания фрагментов вк-ДНК.

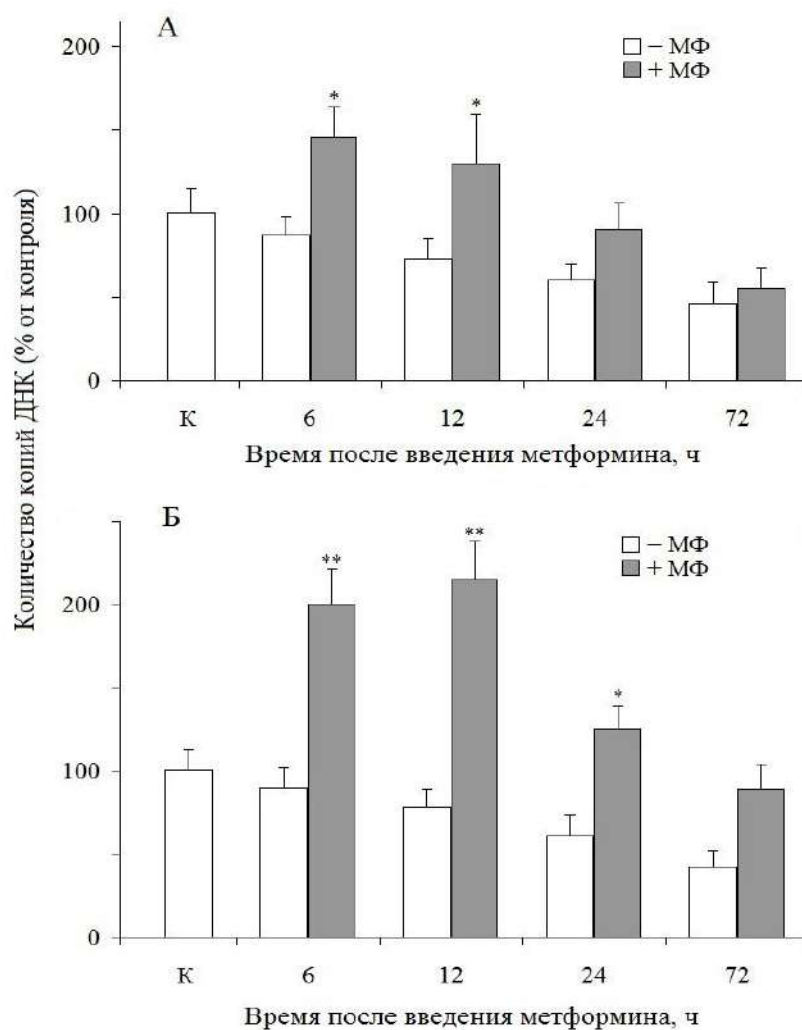


Рисунок 35 – Количество вк-ДНК в моче крыс при введении МФ через 24 часа после облучения (время сбора мочи через 6, 12, 24 и 72 часа после введения МФ). (А) – вк-

яДНК; (Б) – вк-мтДНК. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM ($n = 8$).

Статистическая значимость была установлена при значениях * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Однако результаты этих анализов, по сравнению с данными, полученными после введения животным метформина сразу после облучения, существенно отличаются. Максимальные уровни содержания фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче этих крыс определяются также на 6 и 12 часы после введения им метформина. При этом содержание фрагментов вк-яДНК в моче облученных крыс к 6 и 12 часам после введения им метформина остается повышенным на 50 и 35% соответственно, а содержание вк-мтДНК в эти же сроки повышено на 100 и 120% (относительно контроля – данных полученных у тех же крыс до облучения и введения МФ). К этим же срокам, после облучения крыс в группе животных без введения МФ регистрировалось снижение количества фрагментов вк-яДНК, так и вк-мтДНК, относительно контрольных значений.

Итак, при введении МФ животным сразу и через 24 часа после облучения происходит усиление экскреции вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой. В первом случае мы наблюдаем более выраженное увеличение фрагментов вк-ДНК. Показано, что в моче облученных крыс, независимо от времени проведения анализа вк-ДНК, после их облучения или времени введения им МФ, количественное содержание вк-мтДНК больше, чем таковое фрагментов вк-яДНК. Повышенный уровень мтДНК явно обусловлен активацией митофагии [365, 411]. МФ, возможно, активирует удаление из тканей больше поврежденных клеток, которые могут являться потенциальным для злокачественной трансформации или развития иной патологии [365].

В 2015 году был рассмотрен и идентифицирован новый класс препаратов, названный *senolytics*, которые избирательно удаляют из тканей поврежденные или стареющие клетки [366]. Возможно, МФ также способствует удалению, скорее всего, по механизму аутофагии клеток из тканей облученных животных в пострadiационный период, с которым связано повышение вк-ДНК в моче этих

животных. Препараты, направленные на эти же факторы, выборочно вызывают гибель стареющих клеток [367].

Таким образом, можно предположить, что увеличение экскреции вк-ДНК облученных крыс, после введения им МФ, вызвано гибелью клеток со структурными и функциональными расстройствами. По крайней мере, повышенная экскреция вк-мтДНК после введения им МФ является результатом селективного удаления дефектных митохондрии, посредством митофагии механизмами аутофагии [364-366, 411].

В заключении можно отметить, что ранее Менендес с соавт. высказывали гипотезу о том, что МФ может функционировать в тканях как “уборочная машина” предраковых неблагополучных клеток, не давая им накопиться и полностью трансформироваться в злокачественные клетки [367]. Результаты наших экспериментов демонстрируют реальную работу МФ как “уборочной машины” способствуя удалению неблагополучных клеток из тканей животных, тем самым обеспечивая им повышение выживаемости после действия ионизирующей радиации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, можно констатировать, что в мтДНК возникают больше повреждений, чем в соразмерном фрагменте яДНК, не только в результате действия АФК, генерируемых в самих митохондриях, но и при действии на клетки ИИ.

Этот повышенный уровень повреждений в мтДНК, по сравнению с яДНК, облученных клеток, можно полагать, обусловлен сочетанным действием АФК, генерируемых митохондриях и индуцируемых ИИ. Было показано, что радиационное нарушение ЦПЭ в митохондриях может привести к увеличению АФК и усилению окислительного стресса [99, 434-436]. Что касается высокой частоты повреждений мтДНК, по сравнению с яДНК, в клетках, обработанных различными химическими агентами, то это является, скорее всего, результатом более активного проникновения этих соединений из цитоплазмы в митохондрии.

Таким образом, мтДНК в отличие от яДНК, является более уязвимой мишенью для эндогенных АФК и экзогенных повреждающих агентов.

С другой стороны, анализ многих данных, посвященных исследованию репарации мтДНК, позволяет заключить, что в митохондриях клеток млекопитающих полностью функционируют только те репарационные системы, которые имеют ограниченный набор ферментов [13, 14, 131]. Так, доказано, что механизмы ЭРН не функционируют в митохондриях [133]. Однако показано, что в митохондриях клеток млекопитающих реализуется система ЭРО с короткими заплатками [134]. Кроме ЭРО в митохондриях млекопитающих выявлены и другие системы антимутагенной репарации ДНК [14]. Однако функционирование репарационных процессов ДНК в митохондриях клеток млекопитающих производится на недостаточно эффективном уровне относительно аналогичных показателей в ядрах.

О низкой эффективности функционирования систем репарации в митохондриях млекопитающих свидетельствует множество данных, указывающих

на накопление нерепарированных повреждений и на повышение частоты спонтанных мутаций в мтДНК, по сравнению с яДНК, с возрастом организма. И один из современных постулатов о механизмах старения связан с накоплением структурных изменений в мтДНК клеток тканей с возрастом [40, 53, 140, 166].

В тканях (головного мозга, сердца, скелетных мышц), в популяциях клеток, независимо от их пролиферативной активности и клеточного цикла, мтДНК, в отличие от яДНК, может реплицироваться в течение всей жизни [46, 54]. Более того, если репликация поврежденной яДНК блокируется индуцибельной системой контроля хода клеточного цикла (cell cycle checkpoint) до завершения ее репарации, то, как указывает ряд данных, в митохондриях не происходит блокировки репликации мтДНК, поврежденной ИИ [16, 97, 144].

При этом, можно полагать, что репликативный синтез может протекать не только на неповрежденных копиях мтДНК-матриц, но и на мутированных или поврежденных матрицах. Очевидно, спонтанные и индуцированные (не репарированные или ошибочно репарированные) повреждения мтДНК в последующих кругах репликации будут реализовываться в мутации и делеции митохондриального генома. Скорее всего, именно по этим причинам в мтДНК тканей организма, возможно, возникновение мутаций с более высокой частотой, чем в яДНК, после радиационного воздействия. Согласно данным разных авторов, частота спонтанных и индуцированных мутаций в генах мтДНК в 10-100 раз выше, чем в яДНК [69, 95, 112, 143, 412].

Увеличение частоты повреждений и мутаций в мтДНК тканей мозга, сердца и скелетных мышц, отражается на функциях этих тканей, а также играет значительную роль в развитии дегенеративных процессов и различных патологий [40, 53, 63, 140, 166]. Когда количество мутантных молекул мтДНК превышает определенный порог (повышенный уровень гетероплазии), возникает митохондриальная дисфункция, с которой ассоциируется развитие множества патологий.

Для скрининга спонтанных и индуцированных ИИ точечных мутаций в последовательностях ДНК или отдельных генах млекопитающих на уровне целого организма первостепенное значение приобретает выбор чувствительного и экономичного метода. На основании анализа литературы мы выбрали наиболее адекватных метод для определения мутаций в большом количестве образцов ДНК, получаемых из тканей мышей, подвергнутых радиационному воздействию [438]. Это был – «Surveyor эндонуклеазный метод», основанный на использовании эндонуклеазы, специфически расщепляющей участки ДНК с неспаренными основаниями. Surveyor эндонуклеазный метод позволяет одновременно проводить анализ большого количества образцов ДНК, получать воспроизводимые результаты, не требует сложного оборудования и экономичен. Важнейшим этапом при выявлении мутаций, индуцируемых ИИ, методом Surveyor эндонуклеазы является получение гетеродуплексов путем гибридизации ПЦР-ампликонов участков мтДНК облученных и контрольных животных. Эта процедура дает существенное преимущество для более четкого воспроизводства результатов в параллельных анализах и является необходимым при выявлении мутаций ДНК [438]. Surveyor эндонуклеазный метод является достаточно чувствительным инструментом для выявления мутации в последовательностях ДНК, индуцируемых ИИ [438]. С помощью этого метода может быть выявлена одна мутантная молекула среди 30-35 нормальных (диких) молекул размером около 500-1000 п.н. [413, 414]. Для анализа мутаций мтДНК, индуцируемых ИИ в дозах 1-5 Гр, этим методом мы использовали гетеродуплексы ПЦР-ампликонов мтДНК размером 437-1092 п.н. [438] Что касается определения мутаций мтДНК, возникающих при малых дозах облучения животных, то для этого требуется получение гетеродуплексов ПЦР-ампликонов участков ДНК большего размера (2000-5000 п.н.). Таким образом, метод определения мутаций с использованием Surveyor эндонуклеазы, позволяет достичь необходимой чувствительности.

Полученные нами результаты по определению мутаций мтДНК в тканях и в составе циркулирующей ДНК облученных животных, с использованием Surveyor эндонуклеазы, не позволяют представить расчетные величины по реальной частоте мутаций мтДНК, индуцируемых ИИ. Однако эти данные позволяют характеризовать степень гетероплазии (одновременное присутствие мутантных и диких копий) мтДНК в тканях и биологических жидкостях (плазма, моча) животных, подвергнутых радиационному воздействию [432, 438].

Доля мутантных копий мтДНК (или гетероплазия) в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей, увеличивается в зависимости от дозы рентгеновского излучения [438]. Здесь мы наблюдаем подобную линейную зависимость, которая была выявлена при определении частоты мутаций в составе яДНК тканей головного мозга и селезенки мышей, облученных разными дозами рентгеновского излучения [415, 416]. Результаты наших экспериментов показали, что уровень гетероплазии мтДНК в клетках тканей организма, после радиационного воздействия, существенно повышается, и это может оказывать влияние на многие молекулярные и клеточные процессы, связанные с развитием лучевой реакции организма [436, 438].

Ранее было показано, что ИИ вызывает *in vivo* больше повреждений в мтДНК, чем в соразмерном фрагменте яДНК. Также было установлено, что ИИ индуцирует синтез мтДНК и биогенез митохондрий в клетках тканей животных в течение 2-5 часов после их облучения мышей, [21, 23, 145, 147, 246, 436]. Хотя, механизмы усиления биогенеза митохондрий и синтеза мтДНК после действия ИИ недостаточно ясны, индукция этих процессов ассоциируется с развитием компенсаторной реакции в клетках в связи с повреждением мтДНК и снижением энергообеспечения клеток [148, 149, 436]. Можно полагать, что значительное количество вновь синтезируемых копий мтДНК на поврежденных матрицах будут содержать мутации. Это может привести к возникновению повышенной гетероплазии в клетках тканей облученных животных в пострadiационный период. В течение от 8 до 28 дней

пострадиационного периода, мы обнаружили снижение уровня общего количества копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки мышей, облученных в дозе 3-5 Гр [438]. Увеличение мутантных копий и снижение общего содержания копий мтДНК в тканях мышей в течение длительного пострадиационного периода свидетельствует о нарушении энергетического метаболизма и возникновении дисфункции митохондрий в тканях облученного организма [438]. Такая ситуация в свою очередь может приводить к усилению продукции АФК в митохондриях и последующему увеличению повреждений, с которыми, в определенной мере, связана последующая нестабильность генома облученных клеток [40, 141]. Как установлено в настоящее время, клетки разных тканей, для их нормального функционирования, требуют определенный уровень содержания копий мтДНК [52, 53].

Результаты наших экспериментов показывают, что высокий уровень гетероплазмы (мутантных копий мтДНК) в тканях мышей, наблюдаемый на 8 день после их облучения, постепенно снижается к 28 дню пострадиационного периода. С другой стороны, содержание общего количества мтДНК (из расчета на яДНК) в тканях мышей фактически остается на одинаковом уровне во все сроки исследования после облучения в дозах 1-5 Гр [438]. Заметим, что снижение доли мутантных молекул мтДНК происходит быстрее в селезенке, клетки которой более активно подвержены радиационной гибели, чем клетки головного мозга [438]. Такая динамика снижения мутаций не характерна для яДНК. Как показывают ранее полученные данные Оно и соавторов [416], уровень частоты соматических мутаций, выявляемых в составе яДНК тканей головного мозга и селезенки мышей, подвергнутых воздействию рентгеновским излучением, сохраняется без изменения в течение четырех месяцев.

Одновременно со снижением мутантных копий мтДНК в тканях, мы регистрируем резкое увеличение их доли, со сдвигом максимума на 14 день после облучения, в составе циркулирующей вк-ДНК плазмы этих же мышей [438]. Известно, что соматические клетки с нерепарированными или летальными

повреждениями яДНК могут подвергаться гибели разными путями. В нормальных физиологических условиях в плазме крови животных и человека всегда содержится определенное количество циркулирующей вк-ДНК. При массовой гибели клеток в тканях организма в результате радиационного поражения или при иной патологии, возможно, выявление, значительного повышения уровня вк-ДНК в плазме (сыворотке) крови и других биологических жидкостях [290, 291, 294, 296]. Усиление гибели клеток, при проведении радиотерапии опухолей, сопровождается увеличением содержания вк-ДНК в плазме и в других биологических жидкостях у пациентов [324]. Увеличение содержания общей циркулирующей ДНК в плазме крыс, подвергнутых радиационному воздействию, было показано в работе Владимирова с сотрудниками [317]. Результаты наших анализов показывают, что в плазме мышей доля мутантных копий вк-мтДНК на 14 день после облучения увеличивается в 15 раз (при дозе 5 Гр) по сравнению с контролем, тогда как общее содержание вк-мтДНК увеличивается в 4 раза (рис. 15, 16) [438].

Как известно, гибель клеток тканей облученных животных может происходить различными путями в течение длительного времени и зависит от дозы облучения. При этом, максимум активной гибели различных клеток приходится на 6-10 часы после облучения животных сублетальными дозами радиации [417, 418]. Полученные нами данные, указывающие на увеличение содержания внеклеточной мтДНК с мутациями в плазме крови мышей в течение 28 дней после их облучения, нельзя связывать с максимумом активной фазы апоптоза клеток тканей этих животных. Скорее всего, повышенный уровень мтДНК с мутациями в плазме облученных мышей, можно предполагать, связан с отсроченной гибелью клеток и селективной элиминацией поврежденных и мутантных копий мтДНК из клеток [438].

Циркулирующие фрагменты вк-ДНК, поступающие в кровоток облученных животных, возможно, подвергаются нуклеазной деградации, но определенная ее часть, защищенная от действия нуклеаз, может оказаться в моче, как трансренальная ДНК [290, 432]. В настоящее время моча является традиционно широко

используемым материалом, который содержит огромное разнообразие продуктов метаболизма, чрезвычайно удобных для поиска специфических биомаркеров для диагностики различных патологий [432].

Результаты настоящей работы показывают, что количественные изменения вк-яДНК и вк-мтДНК в моче крыс характеризуются зависимостью от дозы облучения, а также от дозы химиотерапевтического препарата блеомицина [439]. При этом уровень вк-мтДНК в моче крыс выше, по сравнению с таковым яДНК. Определенная доля фрагментов вк-мтДНК в моче облученных крыс содержит мутантные копии [432]. Можно полагать, что повышенный уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче облученных животных обусловлен продолжающейся гибелью клеток тканей, и, возможно, селективной элиминацией копий мтДНК с мутациями из клеток тканей [432, 438].

Известно, что в отдаленные сроки пострadiaционного времени количество гибнущих клеток существенно снижается, но гибель клеток, связанная с индуцированной нестабильностью генома, может продолжаться. Одним из характерных признаков индуцированной нестабильности генома является отсроченная гибель клеток в течение длительного пострadiaционного времени [419, 420]. Возможно, увеличение количества мутантных копий мтДНК приводит к усилению продукции АФК и последующему увеличению повреждений митохондриального генома и митохондриальной дисфункции, которые оказывают влияние на радиационную индукцию нестабильности генома в облученных клетках [101, 310, 421, 422]. Следовательно, развитие каскада этих взаимосвязанных процессов может приводить к продолжению отсроченной клеточной гибели [419, 420] и, соответственно, к выбросу большого количества вк-ДНК в кровоток и мочу облученных животных. Можно предполагать, что повышенный уровень вк-мтДНК с мутациями в плазме крови и моче облученных мышей в отдаленные пострadiaционные сроки обусловлен, также, и селективной элиминацией копий мтДНК с мутациями из клеток тканей [157]. Элиминация мтДНК с мутациями из

клеток может происходить в результате митофагии митохондрий, несущих поврежденные и мутантные копии ДНК [424]. Очевидно, пусковым механизмом митофагии является повреждение макромолекул в митохондриях атаками АФК [423]. Высвобождаемые в результате митофагии фрагменты мтДНК могут поступать в цитозоль [145] и затем в кровоток. Митофагия и постоянный синтез мтДНК способствует обеспечению митохондриального гомеостаза, необходимого для выживания клеток [423, 424].

Таким образом наши исследования позволяют рассматривать количественные и качественные характеристики вк-яДНК и вк-мтДНК в плазме и моче как потенциальные биомаркеры для неинвазивной оценки развития реакции организма на облучение и генотоксического действия средств химиотерапии опухолей [432, 438, 439].

Итак, как выяснилось, структурные и функциональные нарушения в митохондриях, индуцируемые ИИ, оказывают влияние на пострadiaционное развитие целого комплекса эффектов на уровне клеток и целого организма [432, 438, 439].

Поскольку митохондрии и мтДНК повреждаются и могут подвергаться селективному удалению (митофагии) в облученных клетках, возникает необходимость в поиске радиозащитных митохондриально-направленных соединений. В литературе представлено большое количество таких соединений. Однако многие из них не способны преодолевать мембранный барьер митохондрий. Поэтому сейчас разработаны новые подходы к созданию митохондриально-направленных антиоксидантов с радиопротекторными и радиомитигаторными свойствами. Те радиопротекторы, которые ранее считались недостаточно эффективными, при их конъюгации с трифенилфосфонием способны преодолевать митохондриальную мембрану и проникать в митохондрии. Однако существуют соединения, способные преодолевать мембранный барьер митохондрий и без привязки к трифенилфосфонию.

Результаты множества исследований указывают, что в качестве одного из таких активных природных антиоксидантов-радиопротекторов, способных проникать в митохондрии можно рассматривать мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамиин), подавляющий эффекты воздействия ИИ *in vitro* и *in vivo* [425, 434, 435]. В настоящее время мелатонин клинически применяется как препарат, нормализующих циркадные ритмы, а также все чаще находят его применение в качестве адъюванта при лучевой терапии опухолей [426, 427, 434, 435].

Поэтому в настоящей работе были проведены исследования, посвящённые сравнительной оценке ряда маркеров повреждений в тканях коры головного мозга и селезенки после облучения всего тела мышей рентгеновскими лучами и возможности модуляции этих повреждений при введении мелатонина до (режим радиопротекции) и после (режим радиомитигации) их облучения [434, 435]. Результаты наших исследований позволили сделать вывод о том, что мелатонин является достаточно активным радиомитигатором, снижающим, прежде всего, митохондриальную дисфункцию, индуцируемую ионизирующим излучением [434, 435]. Хотя ранее было показано, что мелатонин является эффективным антиоксидантом и радиопротектором, защитником ДНК [336], он не получил рекомендации для клинического использования как радиопротектор, поскольку оказывает нежелательный снотворный эффект у спец. персонала. Полученные нами результаты и литературные данные указывают на необходимость использования мелатонина в качестве радиомитигатора и адъюванта при радиотерапии рака, исключительно после радиационной обработки опухолей. Мелатонин синтезируется в митохондриях и является митохондриально нацеленным антиоксидантом.

Следующие исследования были посвящены препарату метформин, широко используемым в терапии сахарного диабета 2-типа [440-443]. Известно, что метформин является активатором 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы - главного регулятора энергетического гомеостаза. Известно, что метформин снижает частоту возникновения онкогенеза у людей, и увеличивает продолжительность жизни

грызунов. Метформин стимулирует митофагию, обеспечивая восстановление здоровой популяции митохондрий в клетках.

Поскольку наличие циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот в биожидкостях животных и человека принято рассматривать как результат постоянно реализуемой клеточной гибели в их тканях, в данной работе мы исследовали влияния метформина на выживаемость мышей, повреждения ДНК, определяемые по критерию образования микроядер (МЯ) в клетках их костного мозга и на экскрецию вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой крыс, облученных рентгеновскими лучами [440-443]. Результаты показали, что при введении МФ животным сразу и через 24 часа после облучения усиливается экскреция вк-яДНК и вк-мтДНК с мочой. В первом случае мы наблюдаем более выраженное увеличение фрагментов вк-ДНК [440-443]. Показано, что в моче облученных крыс, независимо от времени проведения анализа вк-ДНК, после их облучения или времени введения им МФ, количественное содержание вк-мтДНК больше, чем таковое фрагментов вк-яДНК [440-443]. Повышенный уровень мтДНК явно обусловлен активацией митофагии [365, 411]. МФ, возможно, активирует удаление из тканей больше поврежденных клеток, которые могут являться потенциальным для злокачественной трансформации или развития иной патологии [365, 440-443].

Таким образом, полученные результаты настоящей работы приносят принципиально новые сведения о роли митохондриальных нарушений в развитии лучевой реакции организма, а также о возможности использования такого критерия как уровень вк-мтДНК в биологических жидкостях в качестве неинвазивного высокочувствительного биомаркера для оценки радиационного поражения и наличия генотоксического груза, а также при оценке эффективности противолучевых средств.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что активность репарации яДНК, синтез мтДНК и уровень ее мутантных копий, модуляция экспрессии генов, поддерживающих митохондрии, различаются в гиппокампе, коре и мозжечке облученных крыс. Гиппокамп являлся наиболее радиочувствительной областью головного мозга.
2. Впервые установлено возникновение повышенного уровня мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки мышей, подвергнутых радиационному воздействию. Образование мутантных копий мтДНК в тканях головного мозга и селезенки облученных мышей имеет линейную зависимость от дозы рентгеновского излучения (в пределах 1-5 Гр).
3. Показано, что уровень мутантных копий мтДНК в тканях облученных мышей снижался на 14-й и 28-й дни после облучения. Снижение мутантных копий мтДНК в ткани селезенки происходило более активно, чем в тканях головного мозга. Содержание общей мтДНК относительно яДНК в тканях облученных мышей было стабильно в течение пострadiационного времени (8-28 дней), хотя и ниже на 25-40% данных контрольной группы.
4. Впервые установлено резкое увеличение уровня вк-мтДНК и ее мутантных копий в плазме крови облученных мышей в течение пострadiационного времени (1-28 дней). Увеличение содержания мутантных копий вк-мтДНК в плазме облученных мышей совпадают со снижением их уровня в тканях этих же животных. Результаты свидетельствуют о поступлении в кровоток облученных мышей мутантных копий мтДНК, элиминируемых из тканей этих животных.
5. Впервые показано, что уровень общего количества мтДНК и яДНК в моче облученных крыс зависит как от пострadiационного времени, так и от дозы облучения. Количество продуктов ПЦР-амплификации вк-мтДНК в 2-3 раза выше, по сравнению таковым вк-яДНК. Анализ мутантных копий вк-мтДНК показал, что в моче облученных крыс выявляется определенная доля мутантных

фрагментов мтДНК. При этом максимальный уровень мутантных копий вк-мтДНК в моче крыс регистрируется на 3-е сутки после облучения.

6. Выявлено повышенное содержание фрагментов вк-яДНК и вк-мтДНК в моче у крыс после введения блеомицина по сравнению с контрольными животными. Показано, что содержание вк-яДНК и вк-мтДНК имеет линейную зависимость от дозы химиотерапевтического препарата.
7. Показано, что мелатонин в тканях селезенки и коры головного мозга облученных мышей проявляет выраженные радиозащитные свойства при введении его до и после воздействия радиации. Мелатонин стимулирует пострadiационные восстановления яДНК и мтДНК, снижает уровень мутантных копий мтДНК, а также восстанавливает митохондриальные функции в тканях селезенки и коры головного мозга после облучения.
8. Установлено, что пероральное введение метформина мышам до облучения не оказывало радиопротекторного эффекта, как по тестам выживаемости, так и по образованию МЯ в ПХЭ костного мозга. Метформин действует как радиомитигатор, способствуя усиленной экскреции вк-мтДНК и вк-яДНК с мочой облученных крыс, обеспечивая им повышение выживаемости и восстановление здоровой популяции митохондрий в облученных клетках.
9. Повышенные содержания вк-яДНК и вк-мтДНК в биологических жидкостях (плазма и моча) могут рассматриваться как новые высокочувствительные неинвазивные биомаркеры оценки радиационного ответа организма и других генотоксических агентов, а также оценки эффективности противолучевых средств, в том числе митохондриально-направленного действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kam, W. W-Y. Effects of ionizing radiation on mitochondria / W. W-Y. Kam, R. B. Banati // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – V. 65. – P. 607-619. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024.
2. Ionizing radiation, genotoxic stress, and mitochondrial DNA copy-number variation in *Caenorhabditis elegans*: droplet digital PCR analysis / E. Maremonti, D. A. Brede, A-K. Olsen [et al.] // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* – 2020. – V. 858-860. – Article: 503277. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2020.503277.
3. Amor, H. A systematic review of the impact of mitochondrial variations on male infertility / H. Amor, M. E. Hammadeh // *Genes (Basel).* – 2022. – V. 13. – P. 1182. – DOI 10.3390/genes13071182.
4. A synthetic small RNA homologous to the D-Loop transcript of mtDNA enhances mitochondrial bioenergetics / T. L. Mathuram, D. M. Townsend, V. J. Lynche [et al.] // *Front Physiol.* – 2022. – V. 13. – Article: 772313. – DOI 10.3389/fphys.2022.772313.
5. Chowdhury, A. Role of mitochondrial nucleic acid sensing pathways in health and patho-physiology / A. Chowdhury, S. Witte, A. Aich // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – V. 10. – Article: 796066. – DOI 10.3389/fcell.2022.796066.
6. Nadalutti, C. A. Perspectives on formaldehyde dysregulation: Mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells / C. A. Nadalutti, R. Prasad, S. H. Wilson // *DNA Repair (Amst).* – 2021. – V. 105. – Article: 103134. – DOI 10.1016/j.dnarep.2021.103134.
7. Mitochondrial function and dynamics in neural stem cells and neurogenesis: Implications for neurodegenerative diseases / P. Coelho, L. Fão, S. Mota, A. C. Rego // *Ageing Res Rev.* – 2022. – V. 80. – Article: 101667. – DOI 10.1016/j.arr.2022.101667.

8. Roy, A. Mitochondrial DNA replication and repair defects: Clinical phenotypes and therapeutic interventions / A. Roy, A. Kandettu, S. Ray, S. Chakrabarty // *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* – 2022. – V. 1863. – № 5. – Article: 148554. – DOI 10.1016/j.bbabi.2022.148554.
9. The antiretroviral 2',3'-dideoxycytidine causes mitochondrial dysfunction in proliferating and differentiated HepaRG human cell cultures / C. K. J. Young, J. H. Wheeler, M. M. Rahman, M. J. Young // *J Biol Chem.* – 2021. – V. 296. – Article: 100206. – DOI 10.1074/jbc.RA120.014885.
10. Characterization of G4 DNA formation in mitochondrial DNA and their potential role in mitochondrial genome instability / S. Dahal, H. Siddiqua, V. K. Katapadi [et al.] // *FEBS J.* – 2022. – V. 289. – P. 163-182. – DOI 10.1111/febs.16113.
11. Gaziev, A. I. Pathways for maintenance of mitochondrial DNA integrity and mitochondrial functions in cells exposed to ionizing radiation / A. I. Gaziev // *Radiats Biol Radioecol.* – 2013. – V. 53. – № 2. – P. 117-136. – DOI 10.7868/s0869803113020045.
12. Gaziev, A. I. Lesions of the mitochondrial genome and ways of its preservation / A. I. Gaziev, G. O. Shaikhaev // *Genetika.* – 2008. – V. 44. – № 4. – P. 437-455.
13. Gaziev, A. I. Low efficiency of DNA repair systems in mitochondria / A. I. Gaziev, A. Ya. Podlitsky // *Tsitologiya.* – 2003. – V. 45. – № 4. – P. 403-417.
14. Gredilla, R. Mitochondrial DNA repair and association with aging-an update / R. Gredilla, V. A. Bohr, T. Stevnsner // *Exp Gerontol.* – 2010. – V. 45. – P. 478-487. – DOI 10.1016/j.exger.2010.01.017.
15. Gaziev, A. I. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age / A. I. Gaziev, S. Abdullaev, A. Podlitsky // *Biogerontology.* – 2014. – V. 15. – № 5. – P. 417-438. – DOI 10.1007/s10522-014-9515-2.
16. Cleaver, J. E. Replication of nuclear and mitochondrial DNA in X-ray-damaged cells: evidence for a nuclear-specific mechanism that down-regulates replication / J. E. Cleaver // *Radiat Res.* – 1992. – V. 131. – P. 338-344.

17. Kulawiec, M. P53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway / M. Kulawiec, V. Ayyasamy, K. K. Singh // *Journal of Carcinogenesis*. – 2009. – V. 8. – № 8. – P. 8-19. – DOI 10.4103/1477-3163.50893.
18. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells / T. Shimura, M. Sasatani, H. Kawai [et al.] // *Cell Cycle*. – 2017. – V. 16. – № 6. – P. 565-573. – DOI 10.1080/15384101.2017.1284716.
19. Skulachev, V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis / V. P. Skulachev // *Apoptosis*. – 2006. – V. 11. – P. 473-85. – DOI 10.1007/s10495-006-5881-9.
20. Mitochondrial DNA instability in mammalian cells / G. Carvalho, B. M. Repolês, I. Mendes, P. H. Wanrooij // *Antioxid Redox Signal*. – 2022. – V. 36. – P. 885-905. – DOI 10.1089/ars.2021.0091.
21. The increase in copy number of mitochondrial DNA in tissues of γ -irradiated mice / L. V. Malakhova, V. G. Bezlepkin, V. N. Antipova [et al.] // *Cell Molec Biol Lett*. – 2005. – V. 10. – № 4. – P. 721-732.
22. Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells / J. E. Murphy, S. Nugent, C. Seymour, C. Mothersill // *Mutat. Res*. – 2005. – V. 585. – P. 127-136. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2005.04.011.
23. Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct γ -radiation and bystander factors / S. E. Nugent, C. E. Mothersill, C. Seymour [et al.] // *Radiat Res*. – 2007. – V. 168. – P. 134-142. – DOI 10.1667/RR0769.1.
24. Analysis of common deletion (CD) and a novel deletion of mitochondrial DNA induced by ionizing radiation / L. Wang, Y. Kuwahara, L. Li [et al.] // *Int J Radiat Biol*. – 2007. – V. 83. – P. 433-442. – DOI 10.1080/09553000701370878.

25. Natural radioactivity and human mitochondrial DNA mutations / L. Forster, P. Forster, S. Lutz-Bonengel [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – V. 99. – P. 13950-13954. – DOI 10.1073/pnas.202400499.
26. Changes in the human mitochondrial genome after treatment of malignant disease / T. M. Wardell, E. Ferguson, P. F. Chinnery [et al.] // *Mutat Res*. – 2003. – V. 525. – P. 19-27. – DOI 10.1016/s0027-5107(02)00313-5.
27. Assessing the genotoxicity of chronic environmental irradiation by using mitochondrial DNA heteroplasmy in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) at Chernobyl, Ukraine / J. K. Wickliffe, R. K. Chesser, B. E. Rodgers [et al.] // *Environ Toxicol Chem*. – 2002. – V. 21. – P. 1249-1254. – DOI 10.1002/etc.5620210619.
28. Mitochondrial DNA mutations in individuals occupationally exposed to ionizing radiation / C. S. Wilding, K. Cadwell, E. J. Tawn [et al.] // *Radiat Res*. – 2006. – V. 165. – P. 202-207. – DOI 10.1667/rr3494.1.
29. Characteristics of mitochondrial DNA in the peripheral blood cells of residents of Kazakhstan around Semipalatinsk nuclear test site / A. Hamada, N. J. Chaizhunusova, V. A. Saenko [et al.] // *Int Congr Ser*. – 2003. – V. 1258. – P. 169-176.
30. O-GlcNAcylation of SIRT1 protects against cold stress-induced skeletal muscle damage via amelioration of mitochondrial homeostasis / Y. Cao, M. Zhang, Y. Li [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2022. – V. 23. – Article: 14520. – DOI 10.3390/ijms232314520.
31. Delineating selective vulnerability of inhibitory interneurons in Alpers' syndrome / L. A. Smith, D. Erskine, A. Blain [et al.] // *Neuropathol Appl Neurobiol*. – 2022. – V. 48. – № 6. – Article: e12833. – DOI 10.1111/nan.12833.
32. Mitochondrial disorder and treatment of ischemic cardiomyopathy: Potential and advantages of Chinese herbal medicine / X. Chang, J. Liu, Y. Wang [et al.] // *Biomed Pharmacother*. – 2023. – V. 159. – Article: 114171. – DOI 10.1016/j.biopha.2022.114171.

33. Camara, A. S. Potential therapeutic benefits of strategies directed to mitochondria / A. S. Camara, E. J. Lesnefsky, D. F. Stowe // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2010. – V. 13. – P. 279-347. – DOI 10.1089/ars.2009.2788.
34. Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology / E. Seppet, M. Gruno, A. Peetsalu [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2009. – V. 10. – P. 2252-2303. – DOI 10.3390/ijms10052252.
35. Taylor, R. W. Mitochondrial DNA mutations in human disease / R. W. Taylor, D. M. Turnbull // *Nat Rev Genet*. – 2005. – V. 6. – P. 389-402. – DOI 10.1038/nrg1606.
36. Mitochondrial DNA related disorders / M. Mancuso, M. Filosto, A. Choub [et al.] // *Biosci Rep*. – 2007. – V. 27. – P. 31-37. – DOI 10.1007/s10540-007-9035-2.
37. Palmieri, F. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review / F. Palmieri // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – V. 1777. – P. 564-578. – DOI 10.1016/j.bbabbio.2008.03.008.
38. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach / V. P. Skulachev, V. N. Anisimov, Y. N. Antonenko [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – V. 1787. – P. 437-461. – DOI 10.1016/j.bbabbio.2008.12.008.
39. Mikhailov, V. F. Signal function of the reactive oxygen species in regulatory networks of the cell reaction to damaging effects: contribution of radiosensitivity and genome instability / V. F. Mikhailov, V. K. Mazurik, E. B. Burlakova // *Radiats Biol Radioecol*. – 2003. – P. 43. – № 1. – P. 5-18.
40. Wallace, D. C. Mitochondrial energetics and therapeutics / D. C. Wallace, W. Fan, V. Procaccio // *Annu Rev Pathol*. – 2010. – V. 5. – P. 297-348. – DOI 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092314.
41. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger / S. J. Ralph, S. Rodríguez-Enríquez, J. Neuzil, R. Moreno-Sánchez // *Mol Aspects Med*. – 2010. – V. 31. – P. 29-59. – DOI 10.1016/j.mam.2009.12.006.

42. Кузин, А. М. Радиационная биохимия / А. М. Кузин. – Москва: Изд-во АН СССР, 1962. – 335 с.
43. Okada, S. Radiation Biochemistry / S. Okada. – N. Y.: Acad Press, 1970. – 220 p.
44. Shadel, G. S. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates / G. S. Shadel, D. A. Clayton // *Annu Rev Biochem.* – 1997. – V. 66. – P. 409-435. – DOI 10.1146/annurev.biochem.66.1.409.
45. Scheffer, I. E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives / I. E. Scheffer // *Mitochondrion.* – 2001. – V. 1. – P. 3-31. – DOI 10.1016/S1567-7249(00)00002-7.
46. Falkenberg, M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria / M. Falkenberg, N. G. Larsson, C. M. Gustafsson // *Annu Rev Biochem.* – 2007. – V. 76. – P. 679-699. – DOI 10.1146/annurev.biochem.76.060305.152028.
47. Sequence and organization of the human mitochondrial genome / S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell [et al.] // *Nature.* – 1981. – V. 290. – P. 457-465. – DOI 10.1038/290457a0.
48. Даниленко, Н. Г. Миры геномов органелл / Н. Г. Даниленко, О. Г. Давыденко. – Минск: Тэхналогія, 2003. – 494 с.
49. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA / R.E. Giles, H. Blanc, H.M. Cann, D.C. Wallace // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1980. – V.77. – P. 6715-6719. – DOI 10.1073/pnas.77.11.6715.
50. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR / N. Steuerwald, J. A. Barritt, R. Adler [et al.] // *Zygote.* – 2000. – V. 8. – P. 209-215. – DOI 10.1017/S0967199400001003.
51. Shoubridge, E. A. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte / E. A. Shoubridge, T. Wai // *Curr Top Dev Biol.* – 2007. – V. 77. – P. 87-111. – DOI 10.1016/S0070-2153(06)77004-1.

52. Clay, L. L. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number / L. L. Clay, J. J. Deng, Y. Bai // *Genet Genomics*. – 2009. – V. 36. – P. 125-131. – DOI 10.1016/S1673-8527(08)60099-5.
53. Detection of mitochondrial DNA variation in human cells / K. J. Krishnan, J. K. Blackwood, A. K. Reeve [et al.] // *Methods Mol Biol*. – 2010. – V. 628. – P. 227-257. – DOI 10.1007/978-1-60327-367-1_13.
54. Clayton, D. A. Mitochondrial DNA replication: what we know / D. A. Clayton // *IUBMB Life*. – 2003. – V. 55. – P. 213-217. – DOI 10.1080/1521654031000134824.
55. Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation / C. Rampazzo, P. Ferraro, G. Pontarin [et al.] // *J Biol Chem*. – 2004. – V. 279. – № 17. – P. 17019-17026. – DOI 10.1074/jbc.M313957200.
56. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA / F. Legros, F. Malka, P. Frachon [et al.] // *Cell Sci*. – 2004. – V. 117. – P. 2653-2662. – DOI 10.1242/jcs.01134.
57. DNA-binding proteins of mammalian mitochondria / M. P. Kutsyi, N. A. Gouliaeva, E. A. Kuznetsova, A. I. Gaziev // *Mitochondrion*. – 2005. – V. 5. – P. 35-44. – DOI 10.1016/j.mito.2004.09.002.
58. Electrophile and oxidant damage to mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations / E. Mambo, X. Gao, Y. Cohen [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003. – V. 100. – P. 1838-1843. – DOI 10.1073/pnas.0437910100.
59. DNA polymerase γ in mitochondrial DNA replication and repair / M. A. Graziewicz, M. J. Longley, W. C. Copeland // *Chem Rev*. – 2006. – V. 106. – P. 383-405. – DOI 10.1021/cr040463d.
60. Hudson G. Mitochondrial DNA polymerase- γ and human disease / G. Hudson, P. F. Chinnery // *Hum Mol Genet*. – 2006. – V. 15. – № 2. – P. 244-252. – DOI 10.1093/hmg/ddl233.

61. Graves, S. W. Expression, purification, and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase / S. W. Graves, A. A. Johnson, K. A. Johnson // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – № 17. – P. 6050-6058. – DOI 10.1021/bi972685u.
62. Spelbrink, J. N. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges / J. N. Spelbrink // *IUBMB Life*. – 2010. – V. 62. – № 1. – P. 19-32. – DOI 10.1002/iub.282.
63. Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine / D. C. Wallace // *Annu Rev Genet*. – 2005. – V. 39. – P. 359-407. – DOI 10.1146/annurev.genet.39.110304.095751.
64. Lemire, B. Mitochondrial genetics / B. Lemire // *WormBook: the online review of C. elegans biology*. – 2005.
65. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA / T. Lindahl // *Nature*. – 1993. – V. 362. – P. 709-715. – DOI 10.1038/362709a0.
66. Barnes, D. E. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells / D. E. Barnes, T. Lindahl // *Annu Rev Genet*. – 2004. – V. 38. – P. 445-476. – DOI 10.1146/annurev.genet.38.072902.092448.
67. Beckman, K. B. Endogenous oxidative damage of mtDNA / K. B. Beckman, B. N. Ames // *Mutat Res*. – 1999. – V. 424. – P. 51-68. – DOI 10.1016/s0027-5107(99)00007-x.
68. Does oxidative damage to DNA increase with age? / M. L. Hamilton, H. Van Remmen, J. A. Drake [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2001. – V. 98. – P. 10469-10474. – DOI 10.1073/pnas.171202698.
69. Beckman, K. B. The free radical theory of aging matures / K. B. Beckman, B. N. Ames // *Physiological reviews*. – 1998. – V. 78. – № 2 – P. 548-581. – DOI 10.1152/physrev.1998.78.2.547.

70. Chance, B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol Rev.* – 1979. – V. 59. – № 3. – P. 527-605. – DOI 10.1152/physrev.1979.59.3.527.
71. Papa, S. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications / S. Papa // *Biochim Biophys Acta.* – 1996. – V. 1276. – № 2. – P. 87-105. – DOI 10.1016/0005-2728(96)00077-1.
72. Raha, S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing / S. Raha, B. H. Robinson // *Trends Biochem Sci.* – 2000. – V. 25. – № 5. – P. 502-508. – DOI 10.1016/s0968-0004(00)01674-1.
73. Age-associated change in mitochondrial DNA damage / E. K. Hudson, B. A. Hogue, N. C. Souza-Pinto [et al.] // *Free Radic Res.* – 1998. – V. 29. – № 6. – P. 573-579. – DOI 10.1080/10715769800300611.
74. Demple, B. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology / B. Demple, L. Harrison // *Annu Rev Biochem.* – 1994. – V. 63. – P. 915-948. – DOI 10.1146/annurev.bi.63.070194.004411.
75. Gaziev, A. I. DNA damage in cells exposed to ionizing radiation / A. I. Gaziev // *Radiats Biol Radioecol.* – 1999. – V. 39. – № 6. – P. 630-638.
76. Barja, G. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals / G. Barja, A. Herrero // *FASEB J.* – 2000. – V. 14. – P. 312-318. – DOI 10.1096/fasebj.14.2.312.
77. Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation / H. Nikjoo, P. O'Neill, W. E. Wilson, D. T. Goodhead // *Radiat. Res.* – 2001. – V. 156. – P. 577-583. – DOI 10.1667/0033-7587(2001)156[0577:cafdds]2.0.co;2.
78. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease / M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu [et al.] // *FASEB J.* – 2003. – V. 17. – P. 1195-1214. – DOI 10.1096/fj.02-0752rev.

79. Richter, C. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive / C. Richter, J. W. Park, B. N. Ames // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1988. – V. 85. – P. 6465-6467. – DOI 10.1073/pnas.85.17.6465.
80. Regular exercise reduces 8-oxo dG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats / H. Nakamoto, T. Kaneko, S. Tahara [et al.] // *Exp Gerontol*. – 2007. – V. 42. – P. 3-12. – DOI 10.1016/j.exger.2006.11.006.
81. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging / Y. S. Ma, S. B. Wu, W. Y. Lee [et al.] *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – V. 1790. – P. 1021-1029. – DOI 10.1016/j.bbagen.2009.04.012.
82. Greaves, L. C. Mitochondrial DNA mutations and ageing / L. C. Greaves, D. M. Turnbull // *Biochim Biophys Acta*. – 2009. – V. 1790. – P. 1015-1020. – DOI 10.1016/j.bbagen.2009.04.018.
83. Yakes, F. M. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress / F. M. Yakes, B. Van Houten // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – V. 94. – № 2. – P. 514-519. – DOI 10.1073/pnas.94.2.514.
84. Kaneko, M. The sensitivity to DNA single strand breakage in mitochondria, but not in nuclei, of Chinese hamster V79 and variant cells correlates with their cellular sensitivity to hydrogen peroxide / M. Kaneko, F. Inoue // *Toxicol Lett*. – 1998. – V. 99. – № 1. – P. 15-22. – DOI 10.1016/s0378-4274(98)00132-5.
85. Santos, J. H. Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR / J. H. Santos, B. S. Mandavilli, B. Van Houten // *Methods Mol Biol*. – 2002. – V. 197. – P. 159-176. – DOI 10.1385/1-59259-284-8:159.
86. Hydrogen peroxide– and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells / S. W. Ballinger, C. Patterson, C. Yan [et al.] // *Circ Res*. – 2000. – V. 86. – № 9. – P. 960-966. – DOI 10.1161/01.res.86.9.960.

87. Radiation-induced reactive oxygen species formation prior to oxidative DNA damage in human peripheral T cells / Y. Ogawa, T. Kobayashi, A. Nishioka [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2003. – V. 11. – P. 149-152. – DOI 10.3892/ijmm.11.2.149.
88. Kim, R. Role of mitochondria as the gardens of cell death / R. Kim, M. Emi, K. Tanabe // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2006. – V. 57. – P. 545-553. – DOI 10.1007/s00280-005-0111-7.
89. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis / J. Q. Kwong, M. S. Henning, A. A. Starkov, G. Manfredi // *J Cell Biol.* – 2007. – V. 179. – P. 1163-1177. – DOI 10.1083/jcb.200704059.
90. Targeting mitochondria / A. T. Hoye, J. E. Davoren, P. Wipf [et al.] // *Acc Chem Res.* – 2008. – V. 41. – № 1. – P. 87-97. – DOI 10.1021/ar700135m.
91. Tsutsui, H. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling / H. Tsutsui, S. Kinugawa, S. Matsushima // *Cardiovascular Research.* – 2009. – V. 81. – № 3 – P. 449-456. – DOI 10.1093/cvr/cvn280.
92. Effect of ionizing radiation on liver mitochondrial respiratory functions in mice / J. J. Hwang, G. L. Lin, S. C. Sheu, F. J. Lin // *Chin Med.* – 1999. – V. 112. – № 4 – P. 340-344.
93. Radiation induced cytochrome c release causes loss of rat colonic fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts / J. R. Thiagarajah, P. Gourmelon, N. M. Griffiths [et al.] // *Gut.* – 2000. – V. 47. – № 5. – P. 675-684. – DOI 10.1136/gut.47.5.675.
94. Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide / L. L. Pearce, M. W. Epperly, J. S. Greenberger [et al.] // *Nitric Oxide.* – 2001. – V. 5. – №. 2. – P. 128-136. – DOI 10.1006/niox.2001.0338.
95. Singh, K. K. Mitochondrial DNA polymorphism and risk of cancer / K. K. Singh, M. Kulawiec // *Methods Mol Biol.* – 2009. – V. 471. – P. 291-303. – DOI 10.1007/978-1-59745-416-2_15.

96. May, A. Gene-specific repair of gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells: no coupling to transcription and no removal from the mitochondrial genome / A. May, V. A. Bohr // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2000. – V. 269. – № 2. – P. 433-437. – DOI 10.1006/bbrc.2000.2264.
97. Mitochondrial dysfunction by gamma-irradiation accompanies the induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in rat liver / H. C. Chung, S. H. Kim, M. C. Lee [et al.] // *Toxicology.* – 2001. – V. 161. – P. 79-91. – DOI 10.1016/s0300-483x(01)00332-8.
98. Increase of mitochondrial DNA copies with low level of DNA repair in tissue cells of gamma-irradiated mice / V. N. Antipova, L. V. Malakhova, T. E. Ushakova [et al.] // *Radiats Biol Radioecol.* – 2005. – V. 45. – № 4. – P. 389-396.
99. Role of mitochondrial DNA in radiation exposure / K. Yoshida, H. Yamazaki, S. Ozeki [et al.] // *Radiat Medicine.* – 2000. – V. 18. – № 2. – P. 87-91.
100. Mitochondrial DNA influences radiation sensitivity and induction of apoptosis in human fibroblasts / J. T. Tang, H. Yamazaki, T. Inoue [et al.] // *Anticancer Res.* – 1999. – V. 19. – P. 4959-4964.
101. Mitochondrial mutant cells are hypersensitive to ionizing radiation, phleomycin and mitomycin C / R. Kulkarni, A. Reither, R. A. Thomas [et al.] // *Mutat. Res.* – 2009. – V. 663. – P. 46-51. – DOI 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.004.
102. Mitochondrial gene expression changes in normal and mitochondrial mutant cells after exposure to ionizing radiation / R. Kulkarni, B. Marples, M. Balasubramaniam [et al.] // *Radiat Res.* – 2010. – V. 173. – P. 635-644. – DOI 10.1667/RR1737.1.
103. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen / J. K. Leach, G. Van Tuyle, P. Lin [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – № 10. – P. 3894-3901.
104. Mitochondrial ROS and radiation induced transformation in mouse embryonic fibroblasts / C. Du, Z. Gao, V. A. Venkatesha [et al.] // *Cancer Biol Ther.* – 2009. – V. 8. – № 20. – P. 1962-1971. – DOI 10.4161/cbt.8.20.9648.

105. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons / S. Xu, Z. Zhou, L. Zhang [et al.] // *Brain Res.* – 2010. – V. 1311. – P. 189-196. – DOI 10.1016/j.brainres.2009.10.062.
106. DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA / B. Pascucci, A. Versteegh, A. van Hoffen [et al.] // *J Mol Biol.* – 1997. – V. 273. – P. 417-427. – DOI 10.1006/jmbi.1997.1268.
107. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes / M. L. Paz, D. H. Gonzalez-Maglio, F. S. Weill [et al.] // *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* – 2008. – V. 24. – P. 115-122. – DOI 10.1111/j.1600-0781.2008.00348.x.
108. Birch-Machin, M. A. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue / M. A. Birch-Machin, H. Swalwell // *Mutagenesis.* – 2010. – V. 25. – P. 101-107. – DOI 10.1093/mutage/geb061.
109. Preferential alkylation of mitochondrial deoxyribonucleic acid by N-methyl- N-nitrosourea / V. Wunderlich, M. Schutt, M. Bottger, A. Graffi // *Biochem. J.* – 1970. – V. 118. – № 1. – P. 99-109. – DOI 10.1042/bj1180099.
110. Wilkinson, R. Methylation of rat liver mitochondrial DNA by chemical carcinogens and associated alterations in physical properties / R. Wilkinson, A. Hawks, A. E. Pegg // *Chem Biol Interact.* – 1975. – V. 10. – P. 157-167. – DOI 10.1016/0009-2797(75)90109-x.
111. Niranjana, B.G. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B1 during hepatocarcinogenesis / B. G. Niranjana, N. K. Baht, N. G. Avadhani // *Science.* – 1982. – V. 215. – № 4538. – P. 73-75. – DOI 10.1126/science.6797067.
112. Marcelino, L. A. Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues / L. A. Marcelino, W. G. Thilly // *Mutat Res.* – 1999. – V. 434. – № 3. – P. 177-203. – DOI 10.1016/s0921-8777(99)00028-2.

113. Backer, J. M. Induction of benzo[a]pyrene and its dihydrodiol-epoxide derivative with nuclear and mitochondrial DNA in cell cultures / J. M. Backer, L. B. Weinstein // *Cancer Res.* – 1980. – V. 42. – № 7. – P. 2764-2769.
114. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cells mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA / O. A. Olivero, P. K. Chang, D. M. Lopez-Larrazza [et al.] // *Mutat Res.* – 1997. – V. 391. – P. 79-86. – DOI 10.1016/s0165-1218(97)00037-2.
115. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells / T. Murata, H. Hibasami, S. Mackawa [et al.] // *Biochem Int.* – 1990. – V. 20. – № 5. – P. 949-955.
116. Mitochondrial DNA alterations in blood of the humans exposed to N,N-dimethylformamide / D. B. Shieh, C. C. Chen, T. S. Shih [et al.] // *Chem Biol Interact.* – 2007. – V. 165. – № 3. – P. 211-219. – DOI 10.1016/j.cbi.2006.12.008.
117. DNA-binding proteins of mammalian mitochondria / M. P. Kutsyi, N. A. Gouliaeva, E. A. Kuznetsova, A. I. Gaziev // *Mitochondrion.* – 2005. – V. 5. – № 1. – P. 35-44. – DOI 10.1016/j.mito.2004.09.002.
118. Гуляева, Н. А. Белки, ассоциированные с митохондриальной ДНК, защищают ее от воздействия рентгеновского излучения и перекиси водорода / Н. А. Гуляева, Е. А. Кузнецова, А. И. Газиев // *Биофизика.* – 2006. – Т. 51. – № 4. – С. 692-697.
119. Organization and dynamics of human mitochondrial DNA / F. Legros, F. Malka, P. Frachon [et al.] // *Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – № 13. – P. 2653-2662. – DOI 10.1242/jcs.01134.
120. Spelbrink, J. N. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges / J. N. Spelbrink // *IUBMB Life.* – 2010. – V. 62. – № 1. – P. 19-32. – DOI 10.1002/iub.282.

121. Pandita, T. K. Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response / T. K. Pandita, C. Richardson // *Nucleic Acids Research*. – 2009. – V. 37. – № 5. – P. 1363-1377. – DOI 10.1093/nar/gkn1071.
122. Huertas, D. Chromatin dynamics coupled to DNA repair / D. Huertas, R. Sendra, P. Muñoz // *Epigenetics*. – 2009. – V. 4. – № 1. – P. 31-42. – DOI 10.4161/epi.4.1.7733.
123. May, A. Gene-specific repair of gamma-ray-induced DNA strand breaks in colon cancer cells: no coupling to transcription and no removal from the mitochondrial genome / A. May, V. A. Bohr // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2000. – V. 269. – № 2. – P. 433-437. – DOI 10.1006/bbrc.2000.2264.
124. Targeting mitochondria / A. T. Hoye, J. E. Davoren, P. Wipf [et al.] // *Accounts Chem Res*. – 2008. – V. 41. – P. 87-97. – DOI 10.1021/ar700135m.
125. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA / S. P. LeDoux, W. J. Driggers, B. S. Hollensworth [et al.] // *Mutat Res*. – 1999. – V. 434. – P. 149-159. – DOI 10.1016/s0921-8777(99)00026-9.
126. Marcelino, L. A. Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues / L. A. Marcelino, W. G. Thilly // *Mutat Res*. – 1999. – V. 434. – P. 177-203. – DOI 10.1016/s0921-8777(99)00028-2.
127. LeDoux, S. P. Mitochondrial DNA: a critical target for genotoxic agents / S. P. LeDoux, G. L. Wilson // *AACR 96th Annual Meeting*. – 2005. – P. 261-263.
128. Hanawalt, P. C. Controlling the efficiency of excision repair / P. C. Hanawalt // *Mutat Res*. – 2001. – V. 485. – № 1. – P. 3-13. – DOI 10.1016/s0921-8777(00)00071-9.
129. Ronen, A. Human DNA repair genes / A. Ronen, B. W. Glickman // *Environ Mol Mutagen*. – 2001. – V. 37. – № 3. – P. 241-283. – DOI 10.1002/em.1033.
130. DNA damage and repair: molecular mechanisms to health implications / F. Altieri, C. Grillo, M. Maceroni, S. Chichiarelli // *Antioxid Redox Signal*. – 2008. – V. 10. – P. 1-47. – DOI 10.1089/ars.2007.1830.

131. Stuart, J. A. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics / J. A. Stuart, M. F. Brown // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – V. 1757. – № 2. – P. 79-89. – DOI 10.1016/j.bbabbio.2006.01.003.
132. Nospikel, T. Nucleotide excision repair: variations on versatility / T. Nospikel // *Cell Mol Life Sci*. – 2009. – V. 66. – №. 6. – P. 994-1009. – DOI 10.1007/s00018-009-8737-y.
133. Clayton, D. A. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanisms in mammalian mitochondria / D. A. Clayton, J. N. Doda, E. C. Friedberg // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1974. – V. 71. – № 7. – P. 2777-2781. – DOI 10.1073/pnas.71.7.2777.
134. Bohr, V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells / V. A. Bohr // *Free Radic Biol Med*. – 2002. – V. 32. – № 9. – P. 804-812. – DOI 10.1016/s0891-5849(02)00787-6.
135. Bogenhagen, D. F. Enzymology of mitochondrial base excision repair / D. F. Bogenhagen, K. G. Pinz, R. M. Perez-Jannotti // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. – 2001. – V. 68. – P. 257-271. – DOI 10.1016/s0079-6603(01)68105-4.
136. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria / P. A. Mason, E. C. Matheson, A. G. Hall [et al.] // *Nucl Acids Res*. – 2003. – V. 31. – №. 3. – P. 1052-1058. – DOI 10.1093/nar/gkg167.
137. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria / V. K. Mootha, J. Bunkenborg, J. V. Olsen [et al.] // *Cell*. – 2003. – V. 115. – № 5. – P. 629-640. – DOI 10.1016/s0092-8674(03)00926-7.
138. Larsen, N.B. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? / N. B. Larsen, M. Rasmussen, L. J. Rasmussen // *Mitochondrion*. – 2005. – V. 5. – № 2. – P. 89-108. – DOI 10.1016/j.mito.2005.02.002.
139. Regulation of base excision repair: Ntg1 nuclear and mitochondrial dynamic localization in response to genotoxic stress / D. B. Swartzlander, L. M. Griffiths, J. Lee [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2010. – V. 38. – № 12. – P. 3963-3974. – DOI 10.1093/nar/gkq108.

140. Larsson, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging / N. G. Larsson // *Annu Rev Biochem.* – 2010. – V. 79. – P. 683-706. – DOI 10.1146/annurev-biochem-060408-093701.
141. Profiling mitochondrial proteins in radiation-induced genome-unstable cell lines with persistent oxidative stress by mass spectrometry / J. H. Miller, S. Jin, W. F. Morgan [et al.] // *Radiat Res.* – 2008. – V. 169. – № 6. – P. 700-706. – DOI 10.1667/RR1186.1.
142. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer / J. P. Jakupciak, S. Maragh, M. E. Markowitz [et al.] // *BMC Cancer.* – 2008. – V. 8. – Article: 285. – DOI 10.1186/1471-2407-8-285.
143. Milone, M. Polymerase gamma 1 mutations: clinical correlations / M. Milone, R. Massie // *Neurologist.* – 2010. – V. 16. – № 2. – P. 84-91. – DOI 10.1097/NRL.0b013e3181c78a89.
144. Lalle, A. Effect of ionizing radiation and topoisomerase II inhibitors on DNA synthesis in mammalian cells / A. Lalle, B. Anachkova, G. Russev // *Eur J Biochem.* – 1993. – V. 216. – № 1. – P. 177-181. – DOI 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18130.x.
145. Элиминация мтДНК из митохондрий и активация ее репликации в клетках тканей облученных мышей / М. В. Патрушев, В. Е. Патрушева, В. А. Касымов [и др.] // *Цитология.* – 2006. – Т. 48. – № 8. – С. 684-691.
146. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1 / H. B. Suliman, M. S. Carraway, K. E. Welty-Wolf [et al.] // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 42. – P. 41510-41518. – DOI 10.1074/jbc.M304719200.
147. Replication of murine mitochondrial DNA following irradiation / H. Zhang, D. Maguire, S. Swarts [et al.] // *Adv Exp Med Biol.* – 2009. – V. 645. – P. 43-48. – DOI 10.1007/978-0-387-85998-9_7.

148. Lee, H. C. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress / H. C. Lee, Y. H. Wei // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2005. – V. 37. – № 4. – P. 822-834. – DOI 10.1016/j.biocel.2004.09.010.
149. Газиев, А. И. Повреждение митохондриального генома и пути его сохранения / А. И. Газиев, Г. О. Шайхаев // *Генетика.* – 2008. – Т. 44. – № 4. – С. 437-455.
150. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints / K. A. Nyberg, R. J. Michelson, C. W. Putnam, T. A. Weinert // *Annu Rev Genet.* – 2002. – V. 36. – P. 617-656. – DOI 10.1146/annurev.genet.36.060402.113540.
151. Колтовая, Н. А. Активация репарации и чекпойнт-контроля двунитевыми разрывами ДНК: каскад активационного фосфорилирования белков / Н. А. Колтовая // *Генетика.* – 2009. – Т. 45. – № 1. – С. 5-21.
152. A mitochondria-targeted nitroxide/hemigramicidin s conjugate protects mouse embryonic cells against gamma irradiation / J. Jiang, N. A. Belikova, A. T. Hoye [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2008. – V. 70. – № 3. – P. 816-825. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2007.10.047.
153. Mitochondrial DNA depletion induces radioresistance by suppressing G2 checkpoint activation in human pancreatic cancer cells / C. R. Cloos, D. H. Daniels, A. Kalen [et al.] // *Radiat Res.* – 2009. – V. 171. – № 5. – P. 581-587. – DOI 10.1667/RR1395.1.
154. Srivastava, S. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans / S. Srivastava, C. T. Moraes // *Hum Mol Genet.* – 2005. – V. 14. – № 7. – P. 893-902. – DOI 10.1093/hmg/ddi082.
155. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? / K. J. Krishnan, A. K. Reeve, D. C. Samuels [et al.] // *Nat Genet.* – 2008. – V. 40. – № 3. – P. 275-279. – DOI 10.1038/ng.f.94.
156. Исследование изменения количества копий и формирования делеций митохондриальной ДНК в клетках крови больных раком молочной железы в

- процессе радиохимиотерапии / Л. В. Малахова, В. Н. Антипова, Н. А. Гуляева [и др.] // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52. – № 4. – С. 398-403.
157. Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes / M. F. Alexeyev, N. Venediktova, V. Pastukh [et al.] // Gene Ther. – 2008. – V. 15. – № 7. – P. 516-523. – DOI 10.1038/gt.2008.11.
 158. Mitochondrial DNA heteroplasmy in laboratory mice experimentally enclosed in the radioactive Chernobyl environment / J. K. Wickliffe, B. E. Rodgers, R. K. Chesser [et al.] // Radiat Res. – 2003. – V. 159. – № 4. – P. 458-64. – DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0458:mdhilm]2.0.co;2.
 159. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control / F. Diaz, M. P. Bayona-Bafaluy, M. Rana [et al.] // Nucl Acids Res. – 2002. – V. 30. – № 21. – P. 4626-4633. – DOI 10.1093/nar/gkf602.
 160. Induction of particular deletion in mitochondrial DNA by X rays depends on the inherent radiosensitivity of the cells / N. Kubota, J. I. Hayashi, T. Inada, Y. Iwamura // Radiat. Res. – 1997. – V. 148. – № 4. – P. 395-398.
 161. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation / S. Prithivirajsingh, M. D. Story, S. A. Bergh [et al.] // FEBS Lett. – 2004. – V. 571. – P. 227-232. – DOI 10.1016/j.febslet.2004.06.078.
 162. Schapira, A. H. Mitochondrial disease / A. H. Schapira // Lancet. – 2006. – V. 368. – № 9529. – P. 70-82. – DOI 10.1016/S0140-6736(06)68970-8.
 163. Тодоров, И. Н. Мультифакторная природа высокой частоты мутаций мтДНК соматических клеток млекопитающих / И. Н. Тодоров, Г. И. Тодоров // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – № 9. – С. 1184-1194.
 164. Jou, S. H. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders / S. H. Jou, N. Y. Chiu, C. S. Liu // Chang Gung Med J. – 2009. – V. 32. – № 4. – P. 370-379.

165. Baines, C. P. The cardiac mitochondrion: nexus of stress / C. P. Baines // *Annu Rev Physiol.* – 2010. – V. 72. – P. 61-80. – DOI 10.1146/annurev-physiol-021909-135929.
166. Kumar, P. Huntington's disease: pathogenesis to animal models / P. Kumar, H. Kalonia, A. Kumar // *Pharmacol Rep.* – 2010. – V. 62. – P. 1-14.
167. Kalra, J. Crosslink between mutations in mitochondrial genes and brain disorders: implications for mitochondrial-targeted therapeutic interventions / J. Kalra // *Neural Regen Res.* – 2023. – V. 18. – № 1. – P. 94-101. – DOI 10.4103/1673-5374.343884
168. Schapira, A.H. Mitochondrial disease / A.H. Schapira // *Lancet.* – 2006. – V. 368. – № 9529. – P. 70-82. – DOI 10.1016/S0140-6736(06)68970-8.
169. Brandon, M. Mitochondrial mutations in cancer / M. Brandon, P. Baldi, D.C. Wallace // *Oncogene.* – 2006. – V. 25. – № 34. – P. 4647-4662. – DOI 10.1038/sj.onc.1209607.
170. Mitochondrial DNA as a cancer biomarker / J.P. Jakupciak, W. Wang, M.E. Markowitz [et al.] // *J Mol Diagn.* – 2005. – V. 7. – № 2. – P. 258-267. – DOI 10.1016/S1525-1578(10)60553-3.
171. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – 4th Edn. . – New York: Oxford University Press, 2007. – 960 p.
172. Conn, P.M. Handbook of models for human aging / P.M. Conn. – Amsterdam-Boston: Elsevier AP, 2006. – 290 p.
173. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // *Biochem J.* – 2009. – V. 417. – № 2. – P. 1-13. – DOI 10.1042/BJ20081386.
174. Radi, R. Nitric oxide and per-oxynitrite interactions with mitochondria / R. Radi, A. Cassina, R. Hodara // *Biol Chem.* – 2002. – V. 383. – P. 401-409. – DOI 10.1515/BC.2002.044.
175. Imlay, J.A. Pathways of oxidative damage / J.A. Imlay // *Annu Rev Microbiol.* – 2002. – V. 57. – P. 305-418. – DOI 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.

176. Андреев, А. Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях (обзор) / А. Ю. Андреев, Ю. Е. Кушнарева, А. А. Старков // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246-264. – EDN HSBSSH.
177. Burlakova, E.B. The redox homeiostasis system in radiation-induced genome instability / E.B. Burlakova, V.F. Mikhajlov, V.K. Mazurik // Radiation Biology. Radioecology. – 2001. – Vol. 41, No. 5. – P. 489-499. – EDN MPHRYT.
178. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // Physiol Rev. – 2002. – V. 82. – № 1. – P. 47-95. – DOI 10.1152/physrev.00018.2001.
179. Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures / S.M. Clutton, K.M.S. Townsend, C. Walker [et al.] // Carcinogenesis. – 1996. – V. 17. – № 8. – P. 1633-1639. – DOI 10.1093/carcin/17.8.1633.
180. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation / T. Yoshida, S. Goto, M. Kawakatsu [et al.] // Free Radic Res. – 2012. – V. 46. – № 2. – P. 147-153. – DOI 10.3109/10715762.2011.645207.
181. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology / D.R. Spitz, E.I. Azzam, J.J. Li, D. Gius // Cancer Metastasis Rev. – 2004. – V. 23. – P. 311-322. – DOI 10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc.
182. Dickinson, B.C. Mitochondrial targeted fluorescent probes for reactive oxygen species / B.C. Dickinson, D. Srikun, C.J. Chang // Curr Opin Chem Biol. – 2010. – V. 14. – P. 50-56. – DOI 10.1016/j.cbpa.2009.10.014.
183. Mitochondria targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells / A. Hosoki, S. Yonekura, Q. Zhao [et al.] // J Radiat Res. – 2012. – V. 53. – № 1. – P. 58-71. – DOI 10.1269/jrr.11034.

184. Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation / J.K. Leach, S.M. Black, R.K. Schmidt-Ullrich, R.B. Mikkelsen // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 18. – P. 15400-15406. – DOI 10.1074/jbc.M110309200.
185. Mitochondrial genotypes and radiation-induced micronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro / K. Yoshida, H. Yamazaki, S. Ozeki [et al.] // *Oncol Rep.* – 2001. – V. 8. – № 3. – P. 615-619. – DOI 10.3892/or.8.3.615.
186. Impact of mitochondrial DNA on radiation sensitivity of transformed human fibroblast cells: clonogenic survival, micronucleus formation and cellular ATP level / Y. Yoshioka, H. Yamazaki, K. Yoshida [et al.]. // *Radiat Res.* – 2004. – V. 162. – № 2. – P. 143-147. – DOI 10.1667/rr3207.
187. Mitochondrial DNA depletion induces radioresistance by suppressing G2 checkpoint activation in human pancreatic cancer cells / C.R. Cloos, D.H. Daniels, A. Kalen [et al.] // *Radiat Res.* – 2009. – V. 171. – № 5. – P. 581-587. – DOI 10.1667/RR1395.1.
188. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint / T. Yamamori, H. Yasui, M. Yamazumi [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2012. – V. 53. – № 2. – P. 260-270. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033.
189. Samper, E. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts / E. Samper, D.G. Nicholls, S. Melov // *Aging Cell.* – 2003. – V. 2. – № 5. – P. 277-285. – DOI 10.1046/j.1474-9728.2003.00062.x.
190. A mutation in the SDHC gene of complex II increases oxidative stress, resulting in apoptosis and tumorigenesis / T. Ishii, K. Yasuda, A. Akatsuka [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – № 1. – P. 203-209.
191. Enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species in cybrids containing 4977 bp mitochondrial DNA deletion / M.J. Jou, T.I. Peng, H.Y. Wu, Y.H. Wei //

- Ann NY Acad Sci. – 2005. – V. 1042. – P. 221-228. – DOI 10.1196/annals.1338.024.
192. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage / H.P. Indo, M. Davidson, H.C. Yen [et al.] // Mitochondrion. – 2007. – V. 7. – P. 106-118. – DOI 10.1016/j.mito.2006.11.026.
 193. Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased, oxidative stress, and genomic instability / B.G. Slane, N. Aykin-Burns, B.J. Smith [et al.] // Cancer Res. – 2006. – V. 66. – № 15. – P. 7615-7620. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-0833.
 194. Sensitivity to low dose/low LET ionizing radiation in mammalian cells harboring mutations in succinate dehydrogenase subunit C is governed by mitochondria derived reactive oxygen species / N. Aykin-Burns, B.G. Slane, A.Y. Liu [et al.] // Radiat Res. – 2011. – V. 175. – № 2. – P. 150-158. – DOI 10.1667/rr2220.1.
 195. Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation / D. Dayal, S.M. Martin, K.M. Owens [et al.] // Radiat Res. – 2009. – V. 172. – № 6. – P. 737-745. – DOI 10.1667/RR1617.1.
 196. The mitochondrial genome is a “genetic sanctuary” during the oncogenic process / M. Seoane, A. Mosquera-Miguel, T. Gonzalez [et al.] // PLoS One. – 2011. – V. 6. – № 8. – Article: e23327. – DOI 10.1371/journal.pone.0023327.
 197. Genomic instability induced by mutant succinate dehydrogenase subunit D (SDHD) is mediated by $O_2 (-\bullet)$ and H_2O_2 / K.M. Owens, N. Aykin-Burns, D. Dayal [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2012. – V. 52. – P. 160-166. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.435.
 198. Засухина, Г.Д. Механизмы защиты клеток человека, связанные с генетическим полиморфизмом / Г. Д. Засухина // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 4. – С. 520-535. – EDN HSGOQN.

199. Fukai, T. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases / T. Fukai, M. Ushio-Fukai // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 15. – № 6. – P. 1583-1606. – DOI 10.1089/ars.2011.3999.
200. Zelko, I.N. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression / I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Folz // *Free Radic Biol Med.* – 2002. – V. 33. – № 3. – P. 337-349. – DOI 10.1016/s0891-5849(02)00905-x.
201. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse / A.K. Holley, V. Bakthavatchalu, J.M. Velez-Roman, D.K. Clair // *Int J Mol Sci.* – 2011. – V. 12. – № 10. – P. 7114-7162. – DOI 10.3390/ijms12107114.
202. Association of mitochondrial antioxidant enzymes with mitochondrial DNA as integral nucleoid constituents / J. Kienhofer, D.F. Haussler, F. Ruckelshausen [et al.] // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – № 7. – P. 2034-2044. – DOI 10.1096/fj.08-113571.
203. Dilated cardio-myopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase / Y. Li, T.T. Huang, E.J. Carlson [et al.] // *Nat Genet.* – 1995. – V. 11. – № 4. – P. 376-381. – DOI 10.1038/ng1295-376.
204. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice / R.M. Lebovitz, H. Zhang, H. Vogel [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1996. – V. 93. – № 18. – P. 9782-9787. – DOI 10.1073/pnas.93.18.9782.
205. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase / S. Li, T. Yan, J.Q. Yang [et al.] // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 14. – P. 3927-3939.
206. Ridnour, L.A. Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal / L.A. Ridnour, T.D. Oberley, L.W. Oberley // *Antioxid Redox Signal.* – 2004. – V. 6. – P. 501-512.
207. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy / F.L. Muller, W. Song, Y.

- Liu [et al.] // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – V. 40. – № 11. – P. 1993-2004. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.036.
208. Wong, G.H. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD / G.H. Wong // *Biochim Biophys Acta.* – 1995. – V. 24. – № 1. – P. 205-209. – DOI 10.1016/0925-4439(95)00029-4.
 209. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE / S. Motoori, H.J. Majima, M. Ebara [et al.] // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – № 14. – P. 5382-5388.
 210. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast / J.H. Lee, I.Y. Choi, I.S. Kil [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2001. – V. 1526. – № 2. – P. 191-198. – DOI 10.1016/s0304-4165(01)00126-x.
 211. Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance / Y. Takada, M. Hachiya, S.H. Park [et al.] // *Mol Cancer Res.* – 2002. – V. 1. – № 2. – P. 137-146.
 212. Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation-induced cellular damage / M.W. Epperly, J.E. Gretton, C.A. Sikora [et al.] // *Radiat Res.* – 2003. – V. 160. – № 5. – P. 568-578. – DOI 10.1667/rr3081.
 213. Fisher, C.J. Mitochondria-targeted antioxidant enzyme activity regulates radioresistance in human pancreatic cancer cells / C.J. Fisher, P.C. Goswami // *Cancer Biol Ther.* – 2008. – V. 7. – № 8. – P. 1271-1279. – DOI 10.4161/cbt.7.8.6300.
 214. Overexpression of the transgene for manganese superoxide dismutase (MnSOD) in 32D cl 3 cells prevents apoptosis by TNF-alpha, IL-3 withdrawal, and ionizing radiation / M.W. Epperly, M. Bernarding, J. Gretton [et al.] // *Exp Hematol.* – 2003. – V. 31. – № 6. – P. 465-474. – DOI 10.1016/s0301-472x(03)00041-9.
 215. Zimmerman, M.C. Mutant SOD1-induced neuronal toxicity is mediated by increased mitochondrial superoxide levels / M.C. Zimmerman, L.W. Oberley, S.W.

- Elanagan // J Neurochem. – 2007. – V. 102. – № 3. – P. 609-618. – DOI 10.1111/j.1471-4159.2007.04502.x.
216. Mitochondrial ROS and radiation induced transformation in mouse embryonic fibroblasts / C. Du, Z. Gao, V.A. Venkatesha [et al.] // Cancer Biol Ther. – 2009. – V. 8. – № 20. – P. 1962-1971. – DOI 10.4161/cbt.8.20.9648.
 217. Late ROS accumulation and radiosensitivity in CuZnSOD overexpressing human glioma cells / Z. Gao, E.H. Sarsour, A.L. Kalen [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2008. – V. 45. – № 11. – P. 1501-1509. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.009.
 218. Rieger, K.E. Portrait of transcriptional responses to ultraviolet and ionizing radiation in human cells / K.E. Rieger, G. Chu // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32. – № 16. – P. 4786-4803. – DOI 10.1093/nar/gkh783.
 219. Integrating global gene expression and radiation survival parameters across the 60 cell lines of the National cancer institute anticancer drug screen / S.A. Amundson, K.T. Do, L.C. Vinikoor [et al.] // Cancer Res. – 2008. – V. 68. – № 2. – P. 415-424. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-07-2120.
 220. Roy, L. Cell response to ionizing radiation analysed by gene expression patterns / L. Roy, G. Gruel, A. Vaurijoux // Ann Ist Super Sanita. – 2009. – V. 45. – № 3. – P. 272-277.
 221. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation / L.W. Oberley, D.K. St Clair, A.P. Autor, T.D. Oberley // Arch Biochem Biophys. – 1987. – V. 254. – № 1. – P. 69-80. – DOI 10.1016/0003-9861(87)90082-8.
 222. Irradiation increases superoxide dismutase in rat intestinal smooth muscle / R.W. Summers, B.V. Maves, R.D. Reeves [et al.] // Free Radic Biol Med. – 1989. – V. 6. – № 3. – P. 261-270. – DOI 10.1016/0891-5849(89)90053-1.
 223. Irradiation increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human fibroblasts. Possible mechanisms for its accumulation / M. Akashi, M. Hachiya, R.L.

- Paquette [et al.] // J Biol Chem. – 1995. – V. 270. – № 26. – P. 15864-15869. – DOI 10.1074/jbc.270.26.15864.
224. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses / G. Guo, Y. Yan-Sanders, B.D. Lyn-Cook [et al.] // Mol Cell Biol. – 2003. – V. 23. – № 7. – P. 2362-2378. – DOI 10.1128/MCB.23.7.2362-2378.2003.
 225. Response of cyclin B1 to ionizing radiation: regulation by NFκB and mitochondrial antioxidant enzyme MnSOD / M. Ozeki, D. Tamae, D.X. Hou [et al.] // Anticancer Res. – 2004. – V. 24. – P. 2657-2663.
 226. Low-dose γ-radiation-induced oxidative stress response in mouse brain and gut: regulation by NFκ-MnSOD cross-signaling / J. Veeraraghavan, M. Natarajan, T.S. Herman, N. Aravindan // Mutat Res. – 2011. – V. 718. – P. 44-55. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2010.10.006.
 227. Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress / T. Finkel // Curr Opin Cell Biol. – 2003. – V. 15. – № 2. – P. 247-254. – DOI 10.1016/s0955-0674(03)00002-4.
 228. p53 in mitochondria enhances the accuracy of DNA synthesis / M. Bakhanashvili, S. Grinberg, E. Bonda [et al.] // Cell Death Differ. – 2008. – V. 15. – № 12. – P. 1865-1874. – DOI 10.1038/cdd.2008.122.
 229. Vousden, K.H. Blinded by the light: the growing complexity of p53 / K.H. Vousden, C. Prives // Cell. – 2009. – V. 137. – № 3. – P. 413-431. – DOI 10.1016/j.cell.2009.04.037.
 230. Lebedeva, M.A. Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis / M.A. Lebedeva, J.S. Eaton, G.S. Shadel // Biochim Biophys Acta. – 2009. – V. 1787. – № 5. – P. 328-334. – DOI 10.1016/j.bbabbio.2009.01.004.
 231. P53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis / S.P. Hussain, P. Amstad, P. He [et al.] // Cancer Res. – 2004. – V. 64. – № 7. – P. 2350-2356. – DOI 10.1158/0008-5472.can-2287-2.

232. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor / A.A. Sablina, A.V. Budanov, G.V. Ilyinskaya [et al.] // *Nat Med.* – 2005. – V. 11. – № 12. – P. 1306-1313. – DOI 10.1038/nm1320.
233. Vaseva, A.V. The mitochondrial p53 pathway / A.V. Vaseva, U.M. Moll // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – V. 1787. – № 5. – P. 414-420. – DOI 10.1016/j.bbabbio.2008.10.005.
234. Borras, C. The dual role of p53: DNA protection and antioxidant / C. Borras, M.C. Gomez-Cabrera, J. Vina // *Free Radic Res.* – 2011. – V. 45. – № 6. – P. 643-652. – DOI 10.3109/10715762.2011.571685.
235. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans / A.E. Civitarese, S. Carling, L.K. Heilbronn [et al.] // *PLoS Med.* – 2007. – V. 4. – № 3. – Article: e76. – DOI 10.1371/journal.pmed.0040076.
236. Diaz, F. Mitochondrial biogenesis and turnover / F. Diaz, C.T. Moraes // *Cell Calcium.* – 2008. – V. 44. – № 1. – P. 24-35. – DOI 10.1016/j.ceca.2007.12.004.
237. Jackson, S. The DNA damage response in human biology and disease / S. Jackson, J. Bartek // *Nature.* – 2009. – V. 461. – № 7267. – P. 1071-1078. – DOI 10.1038/nature08467.
238. Gaziev, A.I. Limited repair of critical DNA damage in cells exposed to low dose radiation / A.I. Gaziev, G.O. Shaikhaev // *Current topics in ionizing radiation research.* Ed. M. Nenoj. Rijeka: InTech. – 2012. – P. 51-80. – DOI 10.5772/33611.
239. Hock, M.B. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function / M.B. Hock, A. Kralli // *Annu Rev Physiol.* – 2009. – V. 71. – P. 177-203. – DOI 10.1146/annurev.physiol.010908.163119.
240. Scarpulla, R.C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function / R.C. Scarpulla // *Physiol Rev.* 2008. – V. 88. – № 2. – P. 611-638. – DOI 10.1152/physrev.00025.2007.

241. Goffart, S. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis / S. Goffart, R.J. Wiesner // *Exp Physiol.* – 2003. – V. 88. – № 1. – P. 33-40. – DOI 10.1113/eph8802500.
242. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells / H.C. Lee, P.H. Yin, C.Y. Lu [et al.] // *Biochem J.* – 2000. – V. 348. – P. 425-432.
243. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4.977 BP-deleted mitochondrial DNA / Y.H. Wei, C.F. Lee, H.C. Lee [et al.] // *Ann NY Acad Sci.* – 2001. – V. 928. – P. 97-112. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05640.x.
244. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis / H.B. Suliman, K.E. Welty-Wolf, M.S. Carraway [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 2004. – V. 64. – № 2. – P. 279-288. – DOI 10.1016/j.cardiores.2004.07.005.
245. Oxygen-induced mitochondrial biogenesis in the rat hippocampus / D.R. Gutsaeva, H.B. Suliman, M.S. Carraway [et al.] // *Neuroscience.* – 2006. – V. 137. – № 2. – P. 493-504. – DOI 10.1016/j.neuroscience.2005.07.061.
246. В клетках крови облученных мышей наблюдается изменение количества копий и транскрипция мтДНК, а в сыворотке появляются ее фрагменты / Э.В. Евдокимовский, М.В. Патрушев, Т.Е. Ушакова, А.И. Газиев // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2007. – Т. 47, № 4. – С. 402-407. – EDN IAQWGR.
247. Gong, B. Ionizing radiation stimulates mitochondrial gene expression and activity / B. Gong, Q. Chen, A. Almasan // *Radiat. Res.* – 1998. – V. 150. – P. 505-512.
248. Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging / M. Manczak, Y. Jung, B.S. Park [et al.] // *J Neurochem.* – 2005. – V. 92. – № 3. – P. 494-504. – DOI 10.1111/j.1471-4159.2004.02884.x.
249. Губина, Н.Е. Исследование транскрипции митохондриальной ДНК в клетках печени, скелетной мышцы и головного мозга после рентгеновского облучения

- мышей в дозе 10 Гр / Н.Е. Губина, О.С. Мерекина, Т.Е. Ушакова // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 6. – С. 878-886. – EDN NQWULH.
250. Evdokimovsky, E.V. Alteration of mtDNA copy number, mitochondrial gene expression and extracellular DNA content in mice after irradiation / E.V. Evdokimovsky, T.E. Ushakova, A.I. Gaziev // Radiat Environ Biophys. – 2011. – V. 50. – № 1. – P. 181-188. – DOI 10.1007/s00411-010-0329-6.
 251. Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats / M.N. Gadaleta, G. Rainaldi, A.M. Lezza [et al.] // Mutat Res. – 1992. – V. 275. – P. 181-193. – DOI 10.1016/0921-8734(92)90022-h.
 252. Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging / A. Barrientos, J. Casademont, F. Cardellach [et al.] // Brain Res Mol Brain Res. – 1997. – V. 52. – № 2. – P. 284-289. – DOI 10.1016/s0169-328x(97)00278-7.
 253. Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging / M. Masuyama, R. Iida, H. Takatsuka [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2005. – V. 1723. – P. 302-308. – DOI 10.1016/j.bbagen.2005.03.001.
 254. Graziewicz, M.A. The mitochondrial DNA polymerase as target of oxidative damage / M.A. Graziewicz, B.J. Day, W.C. Copeland // Nucleic Acids Res. – 2002. – V. 30. – № 13. – P. 2817-2824. – DOI 10.1093/nar/gkf392.
 255. Chan, D.C. Mitochondrial fusion and fission in mammals / D.C. Chan // Annu Rev Cell Dev Biol. – 2006. – V. 22. – P. 79-99. – DOI 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104638.
 256. Bereiter-Hahn, J. Mitochondrial dynamics / J. Bereiter-Hahn, M. Jendrach // Int Rev Cell Mol Biol. – 2010. – V. 284. – P. 1-65. – DOI 10.1016/S1937-6448(10)84001-8.
 257. Otera, H. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics / H. Otera, K. Mihara // J Biochem. – 2011. – V. 149. – № 3. – P. 241-251. – DOI 10.1093/jb/mvr002.

258. Okamoto, K. Mitochondria and autophagy: Critical interplay between the two homeostats / K. Okamoto, N. Kondo-Okamoto // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1820. – № 5. – P. 595-600. – DOI 10.1016/j.bbagen.2011.08.001.
259. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria / T. Ono, K. Isobe, K. Nakada, J.I. Hayashi // *Nat Genet*. – 2001. – V. 28. – № 3. – P. 272-275. – DOI 10.1038/90116.
260. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration / J.L. Spees, S.D. Olson, M.J. Whitney, D.J. Prockop // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – V. 103. – № 5. – P. 1283-1288. – DOI 10.1073/pnas.0510511103.
261. Blackstone, C. Mitochondria unite to survive / C. Blackstone, C.R. Chang // *Nat Cell Biol*. – 2011. – V. 13. – № 5. – P. 521-522. – DOI 10.1038/ncb0511-521.
262. Westermann, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death / B. Westermann // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2010. – V. 11. – № 12. – P. 872-884. – DOI 10.1038/nrm3013.
263. Detmer, S.A. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics / S.A. Detmer, D.C. Chan // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2007. – V. 8. – № 11. – P. 870-879. – DOI 10.1038/nrm2275.
264. ER tubules mark sites of mitochondrial division / J.R. Friedman, L.L. Lackner, M. West [et al.] // *Science*. – 2011. – V. 334. – № 6054. – P. 358-362. – DOI 10.1126/science.1207385.
265. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery / C.S. Palmer, L.D. Osellame, D. Stojanovski, M.T. Ryan // *Cell Signal*. – 2011. – V. 23. – № 10. – P. 1534-1545. – DOI 10.1016/j.cellsig.2011.05.021.
266. Liesa, M. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease / M. Liesa, M. Palacin, A. Zorzano // *Physiol Rev*. – 2009. – V. 89. – № 3. – P. 799-845. – DOI 10.1152/physrev.00030.2008.

267. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases / T.P. Reddy, M. Manczak, M.J. Calkins [et al.] // *Brain Res Rev.* – 2011. – V. 67. – P. 103-118. – DOI 10.1016/j.brainresrev.2010.11.004.
268. Adaptative capacity of mitochondrial biogenesis and of mitochondrial dynamics in response to pathogenic respiratory chain dysfunction / G. Benard, T. Trian, N. Bellance [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – V. 19. – № 4. – P. 350-365. – DOI 10.1089/ars.2011.4244.
269. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA / P.A. Parone, S. Da Cruz, D. Tondera [et al.] // *PLoS One.* – 2008. – V. 3. – № 9. – Article: e3257. – DOI 10.1371/journal.pone.0003257.
270. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins / S. Wu, F. Zhou, Z. Zhang, D. Xing. // *FEBS J.* – 2011. – V. 278. – № 6. – P. 941-954. – DOI 10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x.
271. Kobashigawa, S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells / S. Kobashigawa, K. Suzuki, S. Yamashita // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2011. – V. 414. – № 4. – P. 795-800. – DOI 10.1016/j.bbrc.2011.10.006.
272. Twig, G. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy / G. Twig, O.S. Shirihai // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14. – № 10. – P. 1939-1951. – DOI 10.1089/ars.2010.3779.
273. Lee, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling / J. Lee, S. Giordano, J. Zhang // *Biochem J.* – 2012. – V. 441. – № 2. – P. 523-540. – DOI 10.1042/BJ20111451.
274. Autophagy and the degradation of mitochondria / J. Goldman, R. Taylor, Y. Zhang, S. Jin // *Mitochondrion.* – 2010. – V. 10. – № 4. – P. 309-315. – DOI 10.1016/j.mito.2010.01.005.

275. Gomes, L.C. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy / L.C. Gomes, L. Scorrano // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – V. 1833. – № 1. – P. 205-212. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2012.02.012.
276. Youle, R.J. Mechanisms of mitophagy / R.J. Youle, D.P. Narendra // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2011. – V. 12. – № 1. – P. 9-14. – DOI 10.1038/nrm3028.
277. Wang, K. Mitochondria removal by autophagy / K. Wang, D.J. Klionsky // *Autophagy*. – 2011. – V. 7. – № 3. – P. 297-300. – DOI 10.4161/auto.7.3.14502.
278. Kim, I. Selective degradation of mitochondria by mitophagy / I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, J.J. Lemasters // *Arch Biochem Biophys*. – 2007. – V. 462. – № 2. – P. 245-253. – DOI 10.1016/j.abb.2007.03.034.
279. Gomes, L.C. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability / L.C. Gomes, G. Di Benedetto, L. Scorrano // *Nat Cell Biol*. – 2011. – V. 13. – № 5. – P. 589-598. – DOI 10.1038/ncb2220.
280. Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae* / K. Mao, K. Wang, M. Zhao [et al.] // *J Cell Biol* 2011. – V. 193. – № 4. – P. 755-767. – DOI 10.1083/jcb.201102092.
281. Autophagy proteins LC3B, ATG5 and ATG12 participate in quality control after mitochondrial damage and influence lifespan / S. Mai, B. Muster, J. Bereiter-Hahn, M. Jendrach // *Autophagy*. – 2012. – V. 8. – № 1. – P. 47-62. – DOI 10.4161/auto.8.1.18174.
282. Matsushima, Y. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) / Y. Matsushima, Y. Goto, L.S. Kaguni // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2010. – V. 107. – № 43. – P. 18410-18415. – DOI 10.1073/pnas.1008924107.
283. Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease / S. Venkatesh, J. Lee, K. Singh [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1823. – № 1. – P. 56-66. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2011.11.003.

284. Matsushima, Y. Matrix proteases in mitochondrial DNA function / Y. Matsushima, L.S. Kaguni // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1819. – P. 1080-1087. – DOI 10.1016/j.bbagrm.2011.11.008.
285. Gerdes, F. Mitochondrial AAA proteases – Towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines / F. Gerdes, T. Tatsuta, T. Langer // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1823. – № 1. – P. 49-55. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2011.09.015.
286. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy / G. Twig, A. Elorza, A.J. Molina [et al.] // *EMBO J*. – 2008. – V. 27. – № 2. – P. 433-446. – DOI 10.1038/sj.emboj.7601963.
287. Green, D.R. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging / D.R. Green, L. Galluzzi, G. Kroemer // *Science*. – 2011. – V. 333. – № 6046. – P. 1109-1112. – DOI 10.1126/science.1201940.
288. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration / A.B. Knott, G. Perkins, R. Schwarzenbacher, E. Bossy-Wetzel // *Nat Rev Neurosci*. – 2008. – V. 9. – № 7. – P. 505-518. – DOI 10.1038/nrn2417.
289. Mitochondrial DNA as a cancer biomarker / J.P. Jakupciak, W. Wang, M.E. Markowitz [et al.] // *J Mol Diagn*. – 2005. – V. 7. – № 2. – P. 258-267. – DOI 10.1016/S1525-1578(10)60553-3.
290. Umansky, S.R. Transrenal DNA testing: progress and perspectives / S.R. Umansky, L.D. Tomei // *Expert Rev Mol Diagn*. – 2006. – V. 6. – № 2. – P. 153-163. – DOI 10.1586/14737159.6.2.153.
291. Tsang, J.C. Circulating nucleic acids in plasma/serum / J.C. Tsang, Y.M. Lo // *Pathology*. – 2007. – V. 39. – № 2. – P. 197-207. – DOI 10.1080/00313020701230831.
292. Fleischhacker, M. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey / M. Fleischhacker, B. Schmidt // *Biochim Biophys Acta*. – 2007. – V. 1775. – № 1. – P. 181-232. – DOI 10.1016/j.bbcan.2006.10.001.

293. Газиев, А.И. Внеклеточная ДНК плазмы – потенциальный маркер диагностики в онкологии / А.И. Газиев, Г.О. Шайхаев, С.В. Коренев // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 545-554. – EDN JVSVDH.
294. Тамкович, С.Н. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике / С.Н. Тамкович, В.В. Власов, П.П. Лактионов // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42, № 1. – С. 12-23. – EDN IBWYZT.
295. Wright, C.F. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis / C.F. Wright, H. Burton // Hum Reprod Update. – 2009. – V. 15. – № 1. – P. 139-151. – DOI 10.1093/humupd/dmn047.
296. Holdenrieder, S. Clinical use of circulating nucleosomes / S. Holdenrieder, P. Stieber // Crit Rev Clin Lab Sci. – 2009. – V.46. – № 1. – P. 1-24. – DOI 10.1080/10408360802485875.
297. Vlassov, V.V. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers / V.V. Vlassov, P.P. Laktionov, E.Y. Rykova // Curr Mol Med. – 2010. – V. 10. – № 2. – P. 142-165. – DOI 10.2174/156652410790963295.
298. Hall, A. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal DNA technology: applications and implications / A. Hall, A. Bostanci, C.F. Wright // Public Health Genomics. – 2010. – V. 13. – № 4. – P. 246-255. – DOI 10.1159/000279626.
299. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism / I. Botezatu, O. Serdyuk, G. Potapova [et al.] // Clin Chem. – 2000. – V. 46. – P. 1078-1084.
300. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release / M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey [et al.] // Clin Chim Acta. – 2001. – V. 313. – P. 139-142. – DOI 10.1016/s0009-8981(01)00665-9.
301. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy / S.A. Leon, B. Shapiro, D.M. Sklaroff, M.J. Yaros // Cancer Res. – 1977. – V. 37. – № 3. – P. 646-650.

302. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance / Gormally E., Caboux E., Vineis P., Hainaut P. // *Mutat Res.* – 2007. – V. 635. – P. 105-117. – DOI 10.1016/j.mrrev.2006.11.002.
303. Levels of circulating cell-free serum DNA in benign and malignant breast lesions / R.A. Zanetti-Dallenbach, S. Schmid, E. Wight [et al.] // *Int J Biol Markers.* – 2007. – V. 22. – № 2. – P. 95-99. – DOI 10.1177/172460080702200202.
304. Nucleosomes in pancreatic cancer patients during radiochemotherapy / A. Kremer, R. Wilkowski, S. Holdenrieder [et al.] // *Tumour Biol.* – 2005. – V. 26. – № 1. – P. 44-49. – DOI 10.1159/000084339.
305. Tong, Y.K. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids / Y.K. Tong, Y.M. Lo // *Clin Chim Acta.* – 2006. – V. 363. – P. 187-196. – DOI 10.1016/j.cccn.2005.05.048.
306. Swarup, V. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases / V. Swarup, M.R. Rajeswari // *FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – № 5. – P. 795-799. – DOI 10.1016/j.febslet.2007.01.051.
307. Plasma mitochondrial DNA concentrations after trauma / N.L. Lam, T.H. Rainer, R.K. Chiu [et al.] // *Clin Chem.* – 2004. – V. 50. – № 1. – P. 213-216. – DOI 10.1373/clinchem.2003.025783.
308. Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid / W. Zhu, W. Qin, P. Bradley [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2005. – V. 26. – № 1. – P. 145-152. – DOI 10.1093/carcin/bgh282.
309. Chatterjee, A. Mitochondrial DNA mutations in human cancer / A. Chatterjee, E. Mambo, D. Sidransky // *Oncogene.* – 2006. – V. 25. – № 34. – P. 4663-4674. – DOI 10.1038/sj.onc.1209604.
310. A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis / J.S. Park, L.K. Sharma, H.Z. Li [et al.] // *Hum Mol Genet.* – 2009. – V. 18. – № 9. – P. 1578-1589. – DOI 10.1093/hmg/ddp069.

311. Lu, J. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis / J. Lu, L.K. Sharma, Y. Bai // *Cell Res.* – 2009. – V. 19. – № 7. – P. 802-815. – DOI 10.1038/cr.2009.69.
312. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors / C. Kohler, R. Radpour, Z. Barekati [et al.] // *Mol Cancer.* – 2009. – V. 8 – Article: 105. – DOI 10.1186/1476-4598-8-105.
313. Chatterjee, A. Mitochondrial DNA mutations in human cancer / A. Chatterjee, E. Mambo, D. Sidransky // *Oncogene.* – 2006. – V. 25. – № 34. – P. 4663-4674. – DOI 10.1038/sj.onc.1209604.
314. Following mitochondrial footprints through a long mucosal path to lung cancer / S. Dasgupta, R.C. Yung, W.H. Westra [et al.] // *Plos One.* – 2009. – V. 4. – № 8. – Article: e6533. – DOI 10.1371/journal.pone.0006533.
315. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics / F. Diehl, K. Schmidt, M.A. Choti [et al.] // *Nature Med.* – 2008. – V 14. – № 9. – P. 985-990. – DOI 10.1038/nm.1789.
316. Mitochondrial DNA mutations in cancer-from bench to bedside / A.M. Czarnecka, W. Kukwa, T. Krawczyk [et al.] // *Front Biosci.* – 2010. – V. 15. – № 2. – P. 437-460. – DOI 10.2741/3629.
317. Extracellular DNA level in the blood of irradiated rats / V.G. Vladimirov, A.S. Belokhvostov, S.S. Sherlina [et al.] // *Int J Radiat Biol.* – 1992. – V. 62. – № 6. – P. 667-671. – DOI 10.1080/09553009214552611.
318. B1 sequence-based real-time quantitative PCR: a sensitive method for direct measurement of mouse plasma DNA levels after gamma irradiation / H. Zhang, S.B. Zhang, W. Sun [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2009. – V. 74. – № 5. – P. 1592-1599. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2009.03.009.
319. Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR / S. Holdenrieder, P. Stieber, L.Y. Chan [et al.] // *Clin Chem.* – 2005. – V. 51. – № 8. – P. 1544-1546. – DOI 10.1373/clinchem.2005.049320.

320. Circulating cell-free DNA in plasma /serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool / A.K. Pathak, M. Bhutani, S. Kumar [et al.] // Clin Chem. – 2006. – V. 52. – № 10. – P. 1833-1842. – DOI 10.1373/clinchem.2005.062893.
321. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy / O. Gautschi, C. Bigosch, B. Huegli [et al.] // J Clin Oncol. – 2004. – V. 22. – № 20. – P. 4157-4164. – DOI 10.1200/JCO.2004.11.123.
322. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer / S. Holdenrieder, P. Stieber, P.H. Raith [et al.] // Clin Cancer Res. – 2004. – V. 10. – P. 5981-5987. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-0625.
323. Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients / K.C. Chan, S.F. Leung, S.W. Yeung [et al.] // Clin Cancer Res. – 2008. – V. 14. – № 13. – P. 4141-4145. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-08-0182.
324. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy / C. Cheng, M. Omura-Minamisawa, Y. Kang [et al.] // Cancer Sci. – 2009. – V. 100. – № 2. – P. 303-309. – DOI 10.1111/j.1349-7006.2008.01021.x.
325. The human urine metabolome / S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – № 9. – Article: e73076. – DOI 10.1371/journal.pone.0073076.
326. Wild-type mitochondrial DNA copy number in urinary cells as a useful marker for diagnosing severity of the mitochondrial diseases / H. Liu, Y. Ma, F. Fang [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – № 6. – Article: e67146. – DOI 10.1371/journal.pone.0067146.

327. Detection of mitochondrial deoxyribonucleic acid alterations in urine from urothelial cell carcinoma patients / S. Dasgupta, C. Shao, T.E. Keane [et al.] // *Int J Cancer*. – 2012. – V. 131. – № 1. – P. 158-164. – DOI 10.1002/ijc.26357.
328. Umansky, S.R. From transrenal DNA to stem cell differentiation: an unexpected twist / S.R. Umansky // *Clinical Chem*. – 2009. – V. 55. – № 4. – P. 602-604. – DOI 10.1373/clinchem.2008.119552.
329. NASA Radiation biomarker workshop / T. Straume, S.A. Amundson, W.F. Blakely [et al.] // *Radiat Res*. – 2008. – V. 170. – № 3. – P. 393-405. – DOI 10.1667/RR1382.1.
330. Little, J.B. Lauriston S. Taylor lecture: nontargeted effects of radiation: implications for low-dose exposures / J.B. Little // *Health Phys*. – 2006. – V. 91. – № 5. – P. 416-426. – DOI 10.1097/01.HP.0000232847.23192.3e.
331. Microbeam evolution: from single cell irradiation to pre-clinical studies / M. Ghita, C. Fernandez-Palomo, H. Fukunaga [et al.] // *Int J Radiat Biol*. – 2018. – V. 94. – № 8. – P. 708-718. – DOI 10.1080/09553002.2018.1425807.
332. Azzam, E.I. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury / E.I. Azzam, J.P. Jay-Gerin, D. Pain // *Cancer Letters*. – 2012. – V. 327. – P. 48-60. – DOI 10.1016/j.canlet.2011.12.012.
333. Gaziev, A.I. Mitochondrial function and mitochondrial DNA maintenance with advancing age / A.I. Gaziev, S. Abdullaev, A. Podlitsky // *Biogerontology*. – 2014. – V. 15. – № 5. – P. 417-438. – DOI 10.1007/s10522-014-9515-2.
334. Moon, J.J. Role of genomic instability in human carcinogenesis / J.J. Moon, A. Lu, C. Moon // *Exp Biol Med (Maywood)*. – 2019. – V. 244. – № 3. – P. 227-240. – DOI 10.1177/1535370219826031.
335. Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications / J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora [et al.] // *Chem Rev*. – 2017. – V. 117. – № 15. – P. 10043-10120. – DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00042.

336. Galano, A. Melatonin: a versatile protector against oxidative DNA damage / A. Galano, D.X. Tan, R.J. Reiter // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – № 3. – Article: 530. – DOI 10.3390/molecules23030530.
337. Melatonin and cancer: From the promotion of genomic stability to use in cancer treatment / B. Farhood, N.H. Goradel, K. Mortezaee [et al] // *J Cell Physiol*. – 2019. – V. 234. – № 5. – P. 5613-5627. – DOI 10.1002/jcp.27391.
338. Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: molecular mechanisms and clinical implications for newborn care / A. Tarocco, N. Caroccia, G. Morciano [et al.] // *Cell Death Dis*. – 2019. – V. 10. – № 4. – Article: 317. – DOI 10.1038/s41419-019-1556-7.
339. Melatonin enhances the usefulness of ionizing radiation: involving the regulation of different steps of the angiogenic process / A. González-González, A. González, N. Rueda [et al.] // *Front Physiol*. – 2019. – V. 10. – Article: 879. – DOI 10.3389/fphys.2019.00879.
340. Melatonin suppresses lung cancer metastasis by inhibition of epithelial-mesenchymal transition through targeting to Twist / C.C. Chao, P.C. Chen, P.C. Chiou [et al.] // *Clin Sci (Lond)*. – 2019. – V. 133. – № 5. – P. 709-722. – DOI 10.1042/CS20180945.
341. Heitzer, E. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer / E. Heitzer, P. Ulz, J.B. Geigl // *Clin Chem*. – 2015. – V. 61. – № 1. – P. 112-123. – DOI 10.1373/clinchem.2014.222679.
342. Role of circulating cell-free DNA in cancers / R. Aarthy, S. Mani, S. Velusami [et al.] // *Mol Diagn Ther*. – 2015. – V. 19. – № 6. – P. 339-350. – DOI 10.1007/s40291-015-0167-y.
343. Pietrocola, F. Metformin: a metabolic modulator / F. Pietrocola, G. Kroemer // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – № 6. – P. 9017-9020. – DOI 10.18632/oncotarget.14794.

344. Anisimov, V.N. Metformin for cancer and aging prevention: is it a time to make the long story short? / V.N. Anisimov // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – № 37. – P. 39398-39407. – DOI 10.18632/oncotarget.6347.
345. Koritzinsky, M. Metformin: a novel biological modifier of tumor response to radiation therapy / M. Koritzinsky // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 2015. – V. 93. – № 2. – P. 454-464. – DOI 10.1016/j.ijrobp.2015.06.003.
346. Samsuri, N.A.B. Metformin and improved treatment outcomes in radiation therapy / N.A.B. Samsuri, M. Leech, L. Marignol // *Cancer Treat Rev*. – 2017. – V. 55. – P. 150-162. – DOI 10.1016/j.ctrv.2017.03.005.
347. Miller, R.C. Metformin exhibits radiation countermeasures efficacy when used alone or in combination with sulfhydryl containing drugs / R.C. Miller, J.S. Murley, D.J. Grdina // *Radiat Res*. – 2014. – V. 181. – № 5. – P. 464-470. – DOI 10.1667/RR13672.1.
348. Metformin attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis in a murine model / J. Wang, Y. Wang, J. Han [et al.] // *Radiat Res*. – 2017. – V. 188. – № 1. – P. 105-113. – DOI 10.1667/RR14708.1.
349. Cytoplasmic irradiation results in mitochondrial dysfunction and DRP1-dependent mitochondrial fission / B. Zhang, M.M. Davidson, H. Zhou [et al.] // *Cancer Res*. – 2013. – V. 73. – № 22. – P. 6700-6710. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-1411.
350. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells / S. Kobashigawa, G. Kashino, K. Suzuki [et al.] // *Radiat Res*. – 2015. – V. 183. – № 4. – P. 455-464. – DOI 10.1667/RR13772.1.
351. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I / M.Y. El-Mir, V. Nogueira, E. Fontaine [et al.] // *J Biol Chem*. – 2000. – V. 275. – № 1. – P. 223-228. – DOI 10.1074/jbc.275.1.223.

352. Owen, M.R. Evidence that metformin exerts its antidiabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain / M.R. Owen, E. Doran, A.P. Halestrap // *Biochem J.* – 2000. – V. 348. – P. 607-614.
353. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria / H.R. Bridges, A.Y. Jones, M.N. Pollak, J. Hirst // *Biochem J.* – 2014. – V. 462. – № 3. – P. 475-487. – DOI 10.1042/BJ20140620.
354. Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase / H.R. Bridges, V.A. Sirviö, A-N.A. Agip, J. Hirst // *BMC Biology*, – 2016. – V. 14. – P. 65. – DOI 10.1186/s12915-016-0287-9.
355. Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2 / W. De Haes, L. Frooninckx, R. Van Assche [et al.] // *PNAS.* – 2014. – V. 111. – № 24. – P. 2501-2509. – DOI 10.1073/pnas.1321776111.
356. Genome protective effect of metformin as revealed by reduced level of constitutive DNA damage signaling / H.D. Halicka, H. Zhao, J. Li [et al.]. // *Aging.* – 2011. – V. 3. – № 10. – P. 1028-1037. – DOI 10.18632/aging.100397.
357. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage / C. Algire, O. Moiseeva, X. Deschenes-Simard [et al.] // *Cancer Prev Res.* – 2012. – V. 5. – № 4. – P. 536-543. – DOI 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0536.
358. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin / R.J. Shaw, K.A. Lamia, D. Vasquez [et al.] // *Science.* – 2005. – V. 310. – № 5754. – P. 1642-1646. – DOI 10.1126/science.1120781.
359. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK / Y. Storozhuk, S.N. Hopmans, T. Sanli [et al.] // *Br J Cancer.* – 2013. – V. 108. – № 10. – P. 2021-2032. – DOI 10.1038/bjc.2013.187.
360. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin induces protein acetylation in prostate and ovarian cancer cells / L. Galdieri, H. Gatla, I. Vancurova,

- A. Vancura // J Biol Chem. – 2016. – V. 291. – № 48. – P. 25154-25166. – DOI 10.1074/jbc.M116.742247.
361. AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway / T. Sanli, G.R. Steinberg, G. Singh, T. Tsakiridis // Cancer Biol Ther. – 2014. – V. 15. – № 2. – P. 156-169. – DOI 10.4161/cbt.26726.
 362. Metformin induces PGC-1 α expression and selectively affects hepatic PGC-1 α functions / S.M. Aatsinki, M. Buler, H. Salomäki [et al.] // Br J Pharmacol. – 2014. – V. 171. – № 9. – P. 2351-2363. – DOI 10.1111/bph.12585.
 363. Bingol, B. Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond / B. Bingol, M. Sheng // Free Radic Biol Med. – 2016. – V. 100. – P. 210-222. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.015.
 364. Um, J.H. Emerging role of mitophagy in human diseases and physiology / J.H. Um, J. Yun // BMB Rep. – 2017. – V. 50. – № 6. – P. 299-307. – DOI 10.5483/bmbrep.2017.50.6.056.
 365. Metformin restores parkin-mediated mitophagy, suppressed by cytosolic p53 / Y.M. Song, W.K. Lee, Y.H. Lee [et al.] // Int J Mol Sci. – 2016. – V. 17. – № 1. – P. 122. – DOI 10.3390/ijms17010122.
 366. The achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs / Y. Zhu, T. Tchkonja, T. Pirtskhalava [et al.] // Aging Cell. – 2015. – V. 14. – № 4. – P. 644-658. – DOI 10.1111/accel.12344.
 367. Metformin and the ATM DNA damage response (DDR): Accelerating the onset of stress induced senescence to boost protection against cancer / J.A. Menendez, S. Cufí, C. Oliveras-Ferraros [et al.] // Aging. – 2011. – V. 3. – № 11. – P. 1063-1077. – DOI 10.18632/aging.100407.
 368. Buege, J.A. Microsomal lipid peroxidation / J.A. Buege, S.D. Aust // Meth Enzymol. – 1978. – V. 52. – P. 302-310. – DOI 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.

369. Metformin's performance in in vitro and in vivo genetic toxicology studies / J.R. Sant'Anna, J.P. Yajima, L.J. Rosada [et al.] // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2013. – V. 238. – № 7. – P. 803-810. – DOI 10.1177/1535370213480744.
370. Renal tumours in a Tsc1+/- mouse model show epigenetic suppression of organic cation transporters Slc22a1, Slc22a2 and Slc22a3, and do not respond to metformin / J. Yang, M. Kalogerou, J. Gallacher [et al.] // *Eur J Cancer*. – 2013. – V. 49. – № 6. – P. 1479-1490. – DOI 10.1016/j.ejca.2012.10.027.
371. Schmid, W. The micronucleus test / W. Schmid // *Mutat Res*. – 1975. – V. 31. – № 1. – P. 9-15. – DOI 10.1016/0165-1161(75)90058-8.
372. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma / R.W. Chiu, L.Y. Chan, N.Y. Lam [et al.] // *Clin Chem*. – 2003. – V. 49. – № 5. – P. 719-726. – DOI 10.1373/49.5.719.
373. Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA extraction: toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics / C. Stemmer, M. Beau-Faller, E. Pencreach [et al.] // *Clin Chem*. – 2003. – V. 49. – № 11. – P. 1953-1955. – DOI 10.1373/clinchem.2003.020750.
374. PCR based determination of mitochondrial DNA copy number in multiple species / J.P. Rooney, I.T. Ryde, L.H. Sanders [et al.] // *Methods Mol Biol*. – 2015. – V. 1241. – P. 23-38. – DOI 10.1007/978-1-4939-1875-1_3.
375. Quantitative PCR-based measurement of nuclear and mitochondrial DNA damage and repair in mammalian cells / A. Furda, J.H. Santos, J.N. Meyer, B. Van Houten // *Methods Mol Biol*. – 2014. – V. 1105. – P. 419-437. – DOI 10.1007/978-1-62703-739-6_31.
376. Bannwarth, S. Rapid identification of unknown heteroplasmic mitochondrial DNA mutations with mismatch-specific surveyor nuclease / S. Bannwarth, V. Procaccio, V. Paquis-Flucklinger // *Methods Mol Biol*. – 2009. – V. 554. – P. 301-313. – DOI 10.1007/978-1-59745-521-3_19.

377. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J Biol Chem.* – 1951. – V. 193. – P. 265-275.
378. Chida, J. Extraction and quantification of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells / J. Chida, H. Kido // *Methods Mol Biol.* – 2014. – V. 1098. – P. 21-32. – DOI 10.1007/978-1-62703-718-1_2.
379. Ellman, G.L. Reprint of: tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // *Arch Biochem Biophys.* – 1959. – V. 82. – № 1. – P. 70-77. – DOI 10.1016/j.abb.2022.109245.
380. Hladik, D. Effects of ionizing radiation on the mammalian brain / D. Hladik, S. Tapio // *Mutat Res.* – 2016. – V. 770. – P. 219-230. – DOI 10.1016/j.mrrev.2016.08.003.
381. Age-related effects of X-ray irradiation on mouse hippocampus / A. Casciati, K. Dobos, F. Antonelli [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – № 19. – P. 28040-28058. – DOI 10.18632/oncotarget.8575.
382. Cell-densitydependent regulation of neural precursor cell function / C.L. Limoli, R. Rola, E. Giedzinski [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – V. 101. – № 45. – P. 16052-16057. – DOI 10.1073/pnas.0407065101.
383. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure / Y. Wang, E. Xu, P.R. Musich, F. Lin // *CNS Neurosci Ther.* – 2019. – V. 25. – № 7. – P. 816-824. – DOI 10.1111/cns.13116.
384. Lee, W.T. Mitochondrial DNA as an initiator of tumorigenesis / W.T. Lee, J.C. St. John // *Cell Death and Dis.* – 2016. – V. 7. – № 3. – Article: e2171. – DOI 10.1038/cddis.2016.77.
385. Realtime PCR quantification of heteroplasmy in a mouse model with mitochondrial DNA of C57BL/6 and NZB/BINJ Strains / T.S. Machado, C.H. Macabelli, J.R. Sangalli [et al.] // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10. – № 8. – Article: e0133650. – DOI 10.1371/journal.pone.0133650.

386. Quantitative changes in mitochondrial DNA copy number in various tissues of pigs during growth / Y.M. Xie, L. Jin, X.J. Chen [et al.] // *Genet Molec Res.* – 2015. – V. 14. – № 1. – P. 1662-1670. – DOI 10.4238/2015.March.6.12.
387. Van Houten, B. Mitochondrial DNA damage induced autophagy, cell death, and disease / B. Van Houten, S.E. Hunter, J.N. Meyer // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2016. – V. 21. – № 1. – P. 42-54. – DOI 10.2741/4375.
388. Aguilera, A. Causes of genome instability / A. Aguilera, T. Garcia-Muse // *Annu Rev Genet.* – 2013. – V. 47. – P. 1-32. – DOI 10.1146/annurev-genet-111212-133232.
389. McKinnon, P.J. Genome integrity and disease prevention in the nervous system / P.J. McKinnon // *Genes Dev.* – 2017. – V. 31. – № 12. – P. 1180-1194. – DOI 10.1101/gad.301325.117.
390. Enzymatic mutation detection technologies / A.T. Yeung, D. Hattangadi, L. Blakesley, E. Nicolas // *Biotechniques.* – 2005. – V. 38. – № 5. – P. 749-758. – DOI 10.2144/05385RV01.
391. Transrenal nucleic acids: from proof of principle to clinical tests / H.S. Melkonyan, W.J. Feaver, E. Meyer [et al.] // *Ann NY Acad Sci.* – 2008. – V. 1137. – P. 73-81. – DOI 10.1196/annals.1448.015.
392. Circulating nucleic acids and apoptosis / A.V. Lichtenstein, H.S. Melkonyan, L.D. Tomei, S.R. Umansky // *Ann NY Acad Sci.* – 2001. – V. 945. – P. 239-249. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03892.x.
393. Kim, I. Mitophagy selectively degrades individual damaged mitochondria after photoirradiation / I. Kim, J.J. Lemasters // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14. – № 10. – P. 1919-1928. – DOI 10.1089/ars.2010.3768.
394. Selective mitochondrial DNA degradation following double strand breaks / A. Moretton, F. Morel, B. Macao [et al.] // *PLoS ONE.* – 2017. – V. 12. – № 4. – Article: e0176795. – DOI 10.1371/journal.pone.0176795.

395. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery / V. Peeva, D. Blei, G. Trombly [et al.] // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – № 1. – Article: 1727. – DOI 10.1038/s41467-018-04131-w.
396. Zhao, L. Mitochondrial DNA degradation: A quality control measure for mitochondrial genome maintenance and stress response / L. Zhao // *Enzymes.* – 2019. – V. 45. – P. 311-341. – DOI 10.1016/bs.enz.2019.08.004.
397. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment / M. Golpich, E. Amini, Z. Mohamed [et al.] // *CNS Neurosci Ther.* – 2017. – V. 23. – № 1. – P. 5-22. – DOI 10.1111/cns.12655.
398. Mitophagy and mitochondrial biogenesis in atrial tissue of patients undergoing heart surgery with cardiopulmonary bypass / A.M. Andres, K.C. Tucker, A. Thomas [et al.] // *JCI Insight.* – 2017. – V. 2. – № 4. – Article: e89303. – DOI 10.1172/jci.insight.89303.
399. DeBalsi, K.L. Role of the mitochondrial DNA replication machinery in mitochondrial DNA mutagenesis, aging and age-related diseases / K.L. DeBalsi, K.E. Hoff, W.C. Copeland // *Ageing Res Rev.* – 2017. – V. 33. – P. 89-104. – DOI 10.1016/j.arr.2016.04.006.
400. DNA polymerase θ increases mutational rates in mitochondrial DNA / S. Wisnovsky, T. Sack, D.J. Pagliarini [et al.] // *ACS Chem Biol.* – 2018. – V. 13. – № 4. – P. 900-908. – DOI 10.1021/acscchembio.8b00072.
401. Mitochondrial redox signaling at a glance / Y. Collins, E. Chouchani, A. James [et al.] // *J Cell Sci.* – 2012. – V. 125. – P. 801-806. – DOI 10.1242/jcs.098475.
402. Total body irradiation causes a chronic decrease in antioxidant levels / L. Sun, Y. Inaba, Y. Sogo [et al.] // *Sci Rep.* – 2021. – V. 11. – № 1. – Article: 6716. – DOI 10.1038/s41598-021-86187-1.
403. Dose-dependent decrease in antioxidant capacity of whole blood after irradiation: a novel potential marker for biodosimetry / L. Sun, Y. Inaba, K. Sato [et al.] // *Sci Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – Article: 7425. – DOI 10.1038/s41598-018-25650-y.

404. The role of bone marrow and spleen irradiation in the development of acute hematologic toxicity during chemoradiation for esophageal cancer / A.L. Chin, S. Aggarwal, P. Pradhan [et al.] // *Adv Radiat Oncol.* – 2018. – V. 3. – № 3. – P. 297-304. – DOI 10.1016/j.adro.2018.02.005.
405. Sommer, S. Micronucleus assay: the state of art, and future directions / S. Sommer, I. Buraczewska, M. Kruszewski // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21. – № 4. – Article: 1534. – DOI 10.3390/ijms21041534.
406. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin / Vijayalaxmi, Reiter R.J., Sewerynek E. [et al.] // *Radiat Res.* – 1995. – V. 143. – № 1. – P. 102-106.
407. Micronuclei assessment of the radioprotective effects of melatonin and vitamin C in human lymphocytes / A. Rostami, S.A. Moosavi, H.D. Moghadam [et al.] // *Cell J.* – 2016. – V. 18. – № 1. – P. 46-51. – DOI 10.22074/cellj.2016.3986.
408. Mitigation of radiation-induced hematopoietic system injury by melatonin / P. Amini, M. Ashrafizadeh, E. Motevaseli [et al.] // *Environ Toxicol.* – 2020. – V. 35. – № 8. – P. 815-821. – DOI 10.1002/tox.22917.
409. Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers / Vijayalaxmi, R.J. Reiter, T.S. Herman [et al.] // *Mutat Res Genet Toxicol.* – 1996. – V. 371. – P. 221-228. – DOI 10.1016/s0165-1218(96)90110-x.
410. Experimental study of cytoprotective effect of melatonin in radiation exposure / L.V. Pikalova, V.I. Legeza, M.B. Ivanov [et al.] // *Bull Exp Biol Med.* – 2011. – V. 152. – № 1. – P. 76-78. – DOI 10.1007/s10517-011-1458-x.
411. Yamano, K. The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation / K. Yamano, N. Matsuda, K. Tanaka // *EMBO Rep.* – 2016. – V. 17. – № 3. – P. 300-316. – DOI 10.15252/embr.201541486.
412. Khrapko, K. Mitochondrial DNA mutations and aging: devils in the details? / K. Khrapko, J. Vijg // *Trends Genet.* – 2009. – V. 25. – № 2. – P. 91-98. – DOI 10.1016/j.tig.2008.11.007.

413. Rapid identification of mitochondrial DNA mutations in neuromuscular disorders by using surveyor strategy / S. Bannwarth, V. Procaccio, C. Rouzier [et al.] // *Mitochondrion*. – 2008. – V. 8. – № 2. – P. 136-145. – DOI 10.1016/j.mito.2007.10.008.
414. Tsuji, T. Development of a simple and highly sensitive mutation screening system by enzyme mismatch cleavage with optimized conditions for standard laboratories / T. Tsuji, Y. Niida // *Electrophoresis*. – 2008. – V. 29. – № 7. – P. 1473-1483. – DOI 10.1002/elps.200700729.
415. Radiation-induced mutations in the spleen and brain of lacZ transgenic mice / S. Nakamura, H. Ikehata, J. Komura [et al.] // *Int J Radiat Biol*. – 2000. – V. 76. – № 3. – P. 431-440. – DOI 10.1080/095530000138772.
416. Molecular nature of mutations induced by irradiation with repeated low doses of X-rays in spleen, liver, brain and testis of lacZ-transgenic mice / T. Ono, H. Ikehata, P. Vishnu, Y. Uehara // *Int J Radiat Biol*. – 2003. – V. 79. – № 8. – P. 635-641. – DOI 10.1080/09553000310001596931.
417. Maruyama, Y. Relative radiosensitivities of the thymus, spleen and lymphohemopoietic systems / Y. Maruyama, J.M. Feola // *Adv Radiat Biol*. – 1987. – V. 12. – P. 1-82.
418. Programmed cell death in whole body and organ systems by low dose radiation. / T. Nomura, M. Kinuta, T. Hongyo [et al.] // *J Radiat Res*. – 1992. – V. 33. – P. 109-123. – DOI 10.1269/jrr.33.supplement_109.
419. Genomic instability induced by ionizing radiation / W.F. Morgan, J.P. Day, M.I. Kaplan [et al.] // *Radiat Res*. – 1996. – V. 146. – № 3. – P. 247-258.
420. Zhivotovsky, B. Apoptosis and genomic instability / B. Zhivotovsky, G. Kroemer // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2004. – V. 5. – № 9. – P. 752-762. – DOI 10.1038/nrm1443.

421. Mitochondrial modulation of oxygen-dependent radiosensitivity in some human tumour cell lines / S. Anoopkumar-Dukie, T. Conere, G.D. Sisk, A. Allshire / *Br J Radiol.* – 2009. – V. 82. – № 982. – P. 847-854. – DOI 10.1259/bjr/35746067.
422. Bianchi, N.O. Mitochondrial genome instability in cancer / N.O. Bianchi // *Cytogenet Genome Res.* – 2010. – V. 128. – P. 66-76. – DOI 10.1159/000300567.
423. Tolkovsky, A.M. Mitophagy / A.M. Tolkovsky // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – V. 1793. – № 9. – P. 1508-1515. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2009.03.002.
424. He, C. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy / C. He, D.J. Klionsky // *Annu Rev Genet.* 2009. – V. 43. – P. 67-93. – DOI 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
425. PK-PD based optimal dose and time for orally administered suprapharmacological dose of melatonin to prevent radiation induced mortality in mice / S. Choudharya, A. Kumara, N. Sahac [et al.] // *Life Sci.* – 2019. – V. 219. – P. 31-39. – DOI 10.1016/j.lfs.2019.01.007.
426. Role and therapeutic potential of melatonin in various type of cancers / S. Gurunathan, M. Qasim, M.H. Kang [et al.] // *Onco Targets Ther.* – 2021. – V. 18. – P. 2019-2052.
427. Therapeutic targets of cancer drugs: modulation by melatonin / M. Moloudizargari, F. Moradkhani, S. Hekmatirad [et al.] // *Life Sci.* – 2021. – V. 267. – Article: 118934. – DOI 10.1016/j.lfs.2020.118934.
428. Kostyuk, S. Extracellular GC-rich DNA activates TLR9- and NF- κ B-dependent signaling pathways in human adipose-derived mesenchymal stem cells (haMSCs) / S. Kostjuk, P. Loseva, O. Chvartatskaya [et al.] // *Expert Opin. Biol. Th.* – 2012. – V. 12. – № 1. – P. 99-111.
429. An exposure to the oxidized DNA enhances both instability of genome and survival in cancer cells / S.V. Kostyuk, M.S. Konkova, E.S. Ershova [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 10. – Article: e77469.

430. Oxidized DNA induces an adaptive response in human fibroblasts / S.V. Kostyuk, V.J. Tabakov, V.V. Chestkov [et al.] // *Mutat Res.* – 2013. – V.747. – P. 6-18.
431. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endotheliocytes / S.V. Kostyuk, A.V. Ermakov, A.Y. Alekseeva [et al.] // *Mutat. Res.* – 2012. – V. 729. – № (1-2). – P. 52-60.
432. Abdullaev, S.A. Cell-free DNA in the urine of rats exposed to ionizing radiation / S.A. Abdullaev, G.M. Minkabirova, V.G. Bezlepkin, A.I. Gaziev // *Radiation and Environmental Biophysics.* – 2015. – V. 54. – P. 297-304. – DOI 10.1007/s00411-015-0599-0.
433. Абдуллаев, С.А. Функциональная активность митохондрий и их генетического аппарата при действии ионизирующих излучений: Пути стабилизации и защиты // *Актуальные проблемы радиационной биологии: Материалы конференции (Дубна, 25-27 октября 2022 г.).* – Дубна: ОИЯИ, 2022. С. 7.
434. Abdullaev, S. Radioprotective and radiomitigative effects of melatonin in tissues with different proliferative activity / S.A. Abdullaev, S.I. Glukhov, A.I. Gaziev // *Antioxidants.* – 2021. – V.10. 1885. – DOI 10.3390/antiox10121885.
435. Абдуллаев, С.А. Мелатонин снижает радиационные повреждения селезенки и увеличивает выживаемость при его введении до и после воздействия на мышей рентгеновского излучения / С.А. Абдуллаев, С.И. Глухов, А.И. Газиев // *Радиационная биология. Радиоэкология.* – 2022. – Т.62. – №5. – С. 523-531. – DOI 10.31857/S0869803122050034.
436. Abdullaev, S. Assessment of nuclear and mitochondrial DNA, expression of mitochondria-related genes in different brain regions in rats after whole-body X-ray irradiation / S. Abdullaev, N. Gubina, T. Bulanova, A. Gaziev // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – V. 21. – №4. 1196. – DOI 10.3390/ijms21041196.
437. Abdullaev, S. Increase of mtDNA number and its mutant copies in rat brain after exposure to 150 MeV protons / S. Abdullaev, T. Bulanova, G. Timoshenko, A.I.

- Gaziev // *Molecular Biology Reports*. – 2020. – V. 47. – P. 4815-4820. – DOI 10.1007/s11033-020-05491-7.
438. Abdullaev, S.A. Mutant copies of mitochondrial DNA in tissues and plasma of mice subjected to X-ray irradiation / S.A. Abdullaev, S.E. Anishchenko, A.I. Gaziev // *Biophysics*. – 2010. – V. 55. – № 5. P. 840-847. – DOI 10.1134/S0006350910050283.
439. Минкабирова, Г.М. Увеличение содержания внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче крыс после рентгеновского облучения или введения блеомицина / Г.М. Минкабирова, С.А. Абдуллаев // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. – 2019. – Т.64. – №5. – P. 5-8. – DOI 10.12737/1024-6177-2019-64-5-5-8.
440. Gaziev, A. X-rays and metformin cause increased urinary excretion of cell-free nuclear and mitochondrial DNA in aged rats / A. Gaziev, S. Abdullaev, G. Minkabirova, K. Kamenskikh // *Journal of Circulating Biomarkers*. – 2016. – V. 3. P. 1-8. – DOI 10.1177/1849454416670782.
441. Минкабирова, Г.М. Уровень внеклеточной ядерной и митохондриальной ДНК в моче старых крыс резко возрастает после рентгеновского облучения и введения метформина / Г.М. Минкабирова, С.А. Абдуллаев, К.А. Каменских, А.И. Газиев // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2017. – Т.57. – №5. – С. 486-494. – DOI 10.7868/S0869803117050046.
442. Abdullaev, S.A. Metformin prolongs survival rate in mice and causes increased urinary excretion of cell-free DNA in X-irradiated rats / S. Abdullaev, G. Minkabirova, E. Karmanova, V. Bruskov, A. Gaziev // *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2018. – V. 831. – P. 13-18. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2018.05.006.
443. Karmanova, E.E. Antioxidant and genoprotective properties of the antidiabetic drug metformin under X-ray irradiation / E.E. Karmanova, S.A. Abdullaev, V.E. Ivanov,

G.M. Minkabirova, V.I. Bruskov // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V. 487. 012023. – DOI 10.1088/1757-899X/487/1/012023.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Благодарность

Автор выражает особую благодарность научным консультантам диссертационной работы – д.б.н., профессору Газиеву А.И. и д.б.н., профессору РАН Осипову А.Н. за идеи, лежащие в основе представленной работы, ценные советы и всестороннюю помощь. Автор выражает искреннюю признательность чл.-корр. РАН Красавину Е.А. и его коллективу за возможность тесного и плодотворного сотрудничества. Автор благодарит академика РАН Ушакова И.Б., д.м.н., профессора Иванова А.А., д.м.н., профессора Засухину Г.Д., к.б.н. Заичкину С.И. и к.б.н. Кузнецову Е.А. за помощь и обсуждение данной работы.

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

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Акты внедрения

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**Пушкинский государственный
естественно-научный институт**
(ПушГЕНИ)
пр. Науки, д. 3, г. Пушкино,
Московская обл., 142290
Тел. (4967) 73-26-77
E-mail: rector@pushgu.ru
<http://www.pushgu.ru>
ОКПО 32992397, ОГРН 1025007773680
ИНН/КПП 5039005088/503901001

УТВЕРЖДАЮ

и.о. ректора ПушГЕНИ

А.А.Бикбулатова



АКТ

"2" март 2020 г. № 1
г. Пушкино

О внедрении в учебную деятельность ПушГЕНИ результатов диссертационного исследования

Настоящим подтверждается, что результаты диссертационного исследования Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему: «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома», представленного на соискание ученой степени доктора биологических наук, внедрены в учебную деятельность факультета «Биофизики и биомедицины». Основные результаты, новые научные данные, касающиеся исследования возникновения митохондриальной дисфункции, а также выяснения механизмов сохранения целостности митохондриального генома и функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений, используются при реализации магистерских программ, и профессиональной переподготовки специалистов в области радиационной биологии.

Проректор по образовательной деятельности

С.А.Никонова

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИННОВАЦИЙ
И НЕПРЕРЫВНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБУ ГНЦ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ А.И. БУРНАЗЯНА» ФМБА РОССИИ**

АКТ

внедрения в учебную деятельность МБУ ИНО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России результатов диссертационного
исследования

Настоящим подтверждается, что результаты диссертационного исследования Абдуллаева Серажутдина Абдуллаевича на тему: «Пострадиационные механизмы функционирования и стабилизации митохондриального генома», представленного на соискание ученой степени доктора биологических наук, внедрены в учебную деятельность кафедры МБУ ИНО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Основные результаты, положения и выводы диссертации, новые научные данные, касающиеся исследованию возникновения митохондриальной дисфункции, а также выяснению механизмов сохранения целостности митохондриального генома и функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующих излучений, используются при реализации программ ординатуры, программ повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов в области радиобиологии.

Ответственные за внедрение:

Зав. кафедрой радиационной медицины
МБУ ИНО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России
д.м.н., профессор, академик РАН



Л.А. Ильин

Профессор кафедры радиационной медицины
МБУ ИНО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России
к.х.н., д.б.н.



Т.Н. Лашченова

Первый проректор МБУ ИНО ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России
д.м.н., профессор

Подпись 

Заведующий 

Зав. ЦОУ и уч. секретарь 

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна

ФМБА России

Е.В. Голобова



В.Н. Олесова

