

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



Осипов Андрей Андреевич

**Ранние и отдаленные эффекты воздействия рентгеновского
излучения в фибробластах человека: фокусы белков репарации
ДНК, пролиферация, аутофагия и старение**

Специальность: 1.5.1 – Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

**Научный
руководитель**

Осипов Андрей Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН

**Официальные
оппоненты**

Замулаева Ирина Александровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом радиационной биохимии и лабораторией пострадиационного восстановления Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России

Васильев Станислав Анатольевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории инструментальной геномики Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Попова Нелли Рустамовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник с возложением обязанностей заведующей лабораторией изотопных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита диссертации состоится «11» сентября 2024 г. в 16 часов 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу:

119991, Москва, ГСП-1, ул. Ленинские горы, д. 1 стр. 10, ауд. 308.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин - учёный секретарь диссертационного совета МГУ.014.6); a-2-osipov@yandex.ru (А.А. Осипов - соискатель).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3057>

Автореферат разослан « » июля 2024 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета МГУ.014.6,
кандидат химических наук

А.В. Северин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ионизирующее излучение (ИИ) широко используется как для диагностики, так и для лечения злокачественных новообразований человека. Во время радиологических процедур облучению подвергаются не только опухолевые клетки, но и нормальные клетки человека, в частности фибробласты. Воздействие ИИ на фибробласты нормальных тканей в зависимости от дозы, мощности дозы и физических характеристик ИИ, может привести к их гибели (Babayan, Grigoryan et al. 2019), утрате способности к делению, старению (Aliper, Vozdaganyan et al. 2019) или, наоборот, активации с избыточной продукцией белков, таких как коллаген и фибронектин (Straub, New et al. 2015). В зависимости от судьбы облученных фибробластов, могут развиваться различные негативные тканевые эффекты, включая воспаление, фиброз и дисфункцию тканей (Rodel, Fournier et al. 2017, Kosmacek and Oberley-Deegan 2020, Luo, Chen et al. 2021).

Среди различных типов радиационно-индуцированных повреждений ДНК, наиболее опасными являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК (Shibata and Jeggo 2019, Mladenov, Mladenova et al. 2023, Nickoloff, Sharma et al. 2023). Точность и эффективность процесса репарации этих повреждений фактически определяют дальнейшую судьбу облученных клеток: поддержание или ограничение пролиферации, гибель и старение (Krenning, van den Berg et al. 2019). В клетках, которые продолжают делиться, несмотря на ошибки репарации ДНК, увеличивается вероятность онкологической трансформации (Torgovnick and Schumacher 2015). В результате некорректной репарации ДНК, особенно по механизмам альтернативного соединения концов и опосредованного микрогомологией соединения концов, возникают микроструктурные хромосомные aberrации и различные цитогенетические нарушения (хромосомные aberrации стабильного и нестабильного типов, микроядра), а невозможность репарации приводит к запуску механизмов клеточной гибели или клеточного старения (White and Vijg 2016, Sishc and Davis 2017, Jiang 2022).

В настоящее время наиболее информативным и чувствительным методом анализа ДР ДНК является иммуноцитохимический анализ белков, участвующих в отклике клеток на повреждение ДНК (DNA damage response – DDR) (Bushmanov, Vorobyeva et al. 2022). Динамические микроструктуры, состоящие из сотен и тысяч различных белков, участвующих в DDR и локализованных в областях, прилегающих к ДР ДНК, называются фокусами повреждения ДНК (Rothkamm, Barnard et al. 2015, Barbieri, Babini et al. 2019) или фокусами белков репарации ДНК (Belyaev 2010, Penninckx, Pariset et al. 2021). Наиболее часто изучаемыми белками, образующими фокусы, являются гистон H2AX, фосфорилированный по серину 139 (γ H2AX) (Raavi, Pegumal et al. 2021, Wanotayan, Chousangsunton et al. 2022), белок 53BP1 (P53-связывающий белок 1) (Jakl, Markova et al. 2020, Kocher, Volquardsen et al. 2021, Falaschi, Chiaramonte et al. 2023) и киназа ATM (мутантный белок атаксии телеангиэктазии), фосфорилированная по серину 1981 (pATM) (Slonina, Kowalczyk et al. 2018, Ulyanenko, Pustovalova et al. 2019).

Фокусы, наблюдаемые через 24 часа и позже после облучения, называются «остаточными» (Belyaev 2010, Osipov, Chigasova et al. 2023). Оценка остаточных фокусов γ H2AX может служить прогностическим инструментом для оценки радиационно-индуцированной гибели клеток (Olive 2011, Anglada, Terradas et al. 2016). Продемонстрировано, что увеличение количества остаточных фокусов связано со снижением колониеобразующей способности (Babayan, Vorobyeva et al. 2020). Однако особенности их пострадиационных количественных изменений и роль в процессах изменений пролиферативной активности, гибели и старения клеток все еще недостаточно изучены. Особо спорным является вопрос о роли фокусов DDR в формировании отдаленных эффектов облучения. Ведутся дискуссии, обусловлено ли повышение их количества в потомках облученных клеток трансгенерационной передачей начальных

повреждений и ошибками во время митоза или образованием нарушений *de novo* вследствие радиационной нестабильности генома. В особенности это касается эффектов облучения в малых дозах (10-100 мГр). До сих пор не ясно, насколько опасно облучение в малых дозах для потомков облучённых клеток и существует ли дозовый порог, ниже которого ИИ не вызывает негативных эффектов. Все эти вопросы являются одними из наиболее актуальных и дискуссионных в современной радиационной биологии.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлся анализ дозовых зависимостей и взаимосвязи между изменением количества фокусов ключевых белков DDR (γ H2AX (сенсор), pATM (трансдуктор), 53BP1 (медиатор), p-p53(Ser15) (эффектор)) и фракциями покоящихся, β -галактозидаза, каспазо-3 и LC3-II позитивных клеток в популяциях культивируемых фибробластов дермы кожи человека в ранний и отдаленный периоды после облучения рентгеновским излучением в дозах от 0,1 до 5(10) Гр.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Выполнить анализ зависимостей доза-эффект для фокусов белков репарации ДНК через 0,5 и 4 ч после облучения в дозах от 0,1 до 5 Гр;

2) Провести анализ дозовых зависимостей и возможного дозового порога для остаточных фокусов белков репарации ДНК через 24, 48 и 72 ч после облучения в дозах от 0,1 до 10 Гр;

3) Охарактеризовать взаимосвязь между остаточными фокусами белков репарации ДНК, пролиферативной активностью, а также долей β -галактозидаза, каспазо-3 и LC3-II позитивных клеток через 24, 48 и 72 ч после облучения в дозах от 0,1 до 10 Гр.

4) Оценить связь между количеством остаточных фокусов белков репарации ДНК и клоногенной выживаемостью облучённых клеток.

5) Провести комплексное исследование молекулярных и клеточных эффектов в потомках клеток (до 15 клеточного пассажа), облучённых в малой (0,1 Гр) и больших дозах (2 и 5 Гр).

Научная новизна. Впервые проведено одновременное исследование зависимостей доза-эффект и пострадиационных изменений (от 0,5 до 72 ч) количества фокусов белков, представляющих основные функциональные классы белков DDR (γ H2AX (сенсор), pATM (трансдуктор), 53BP1 (медиатор), p-p53(Ser15) (эффектор)), в фибробластах дермы кожи человека, облучённых рентгеновским излучением в широком интервале доз (от 0,1 до 5(10) Гр). Показано, что дозовые зависимости изменений количества фокусов всех изученных белков в фибробластах человека через 0,5 и 4 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах 0,1-5 Гр характеризуются линейным участком при дозах до 1 Гр, после чего наблюдается эффект «насыщения». Продемонстрировано, что в соответствии с количественным выходом остаточных фокусов (24-72 ч после облучения), исследуемые белки могут быть расположены в порядке убывания: γ H2AX > 53BP1 > pATM \geq p-p53 (Ser-15). Впервые определены пороговые дозы для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения клеток и доказано, что они близки к полученной на тех же клетках квазипороговой дозе D_q , характеризующей ширину плечевой области, где возможно восстановление облучённых клеток, на кривой клоногенной выживаемости клеток. Впервые выполнен анализ взаимосвязи между остаточными фокусами белков репарации ДНК, пролиферативной активностью, а также долей β -галактозидаза позитивных, каспазо-3 позитивных и LC3-II позитивных (аутофагических) клеток в популяциях облучённых фибробластов. Продемонстрировано, что старение и аутофагия в популяциях облучённых фибробластов действуют как партнеры, усиливая друг друга и снижая долю клеток позитивных по апоптотической эффекторной каспазе-3. Показано существование дозового порога для формирования отдаленных молекулярных и клеточных эффектов в фибробластах, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения. Впервые

обнаружено, что после облучения в дозе 5 Гр при пассировании до 5 пассажа клеток наблюдалось стойкое сохранение повышенного количества фокусов белков репарации ДНК, сопровождающееся низкой пролиферативной активностью и высокой долей β -галактозидаза позитивных и аутофагических клеток. После облучения в дозе 2 Гр отдаленные негативные эффекты облучения, ассоциированные с клеточным старением, были обнаружены только на 15 пассаже после облучения. Продемонстрировано, что воздействие рентгеновского излучения в малой дозе (0,1 Гр) на культивируемые фибробласты дермы кожи человека не приводит к увеличению количества фокусов белков репарации ДНК, снижению пролиферативной активности и преждевременному старению на 5, 10 и 15 пассажах после облучения.

Положения, выносимые на защиту:

1) По количественному выходу фокусов белков репарации ДНК (в пересчёте на единицу поглощенной дозы) в культивируемых фибробластах дермы кожи человека через 0,5 и 24-72 ч после воздействия рентгеновского излучения исследуемые белки располагаются в порядке убывания: γ H2AX > 53BP1 > pATM \geq p-p53(Ser-15).

2) Дозозависимое увеличение количества остаточных (через 24-72 ч после облучения) фокусов γ H2AX, 53BP1 pATM и p-p53(Ser-15) в культивируемых фибробластах дермы кожи человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения, ассоциировано со снижением пролиферативной активности и увеличением доли LC3-II и β -галактозидаза позитивных клеток.

3) Количество остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 в культивируемых фибробластах дермы кожи человека через 48 и 72 ч после облучения рентгеновским излучением является прогностическим критерием радиационно-индуцированной репродуктивной гибели клеток.

4) Воздействие рентгеновского излучения в малой дозе (0,1 Гр) не вызывает увеличения количества фокусов белков репарации ДНК, а также не приводит к снижению пролиферативной активности и преждевременному старению в потомках культивируемых облучённых фибробластов дермы кожи человека на 5, 10 и 15 клеточных пассажах после облучения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационного исследования важны для понимания закономерностей и механизмов формирования ранних и отдаленных молекулярных и клеточных эффектов в фибробластах человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения во время диагностических радиологических процедур и терапии злокачественных новообразований. Детальное понимание этих механизмов необходимо для идентификации молекулярных мишеней, разработки стратегий радиационной защиты клеток нормальных тканей в процессе лучевой терапии и уточнения предельно допустимых дозовых нагрузок. Результаты исследования представляют особый интерес для моделирования и прогнозирования побочных эффектов облучения при лучевой диагностике и терапии. Полученные результаты будут крайне востребованы в качестве референтных при исследовании молекулярных и клеточных эффектов ионизирующих излучений с различными физическими излучениями (протоны, нейтроны, тяжёлые ионы), разработке новых технологий лучевой терапии и в космической радиобиологии. Полученные в работе зависимости «доза-эффект» также чрезвычайно важны для дальнейшего развития и совершенствования радиационной биодозиметрии.

Методология и методы исследования. В процессе подготовки и выполнения диссертационного исследования использовались последние теоретические и методические разработки отечественных и зарубежных ученых в области клеточной и молекулярной радиационной биологии. Для поиска литературы по теме исследования использовались

реферативные и библиографические базы данных (Elibrary, PubMed, Scopus, Web of Science и др.). При проведении работы были использованы: культивирование фибробластов дермы кожи человека; облучение на рентгеновской биологической установке; радиометрия и дозиметрия; иммуноцитохимический анализ фокусов белков репарации ДНК; иммуноцитохимический анализ клеточной пролиферации, активности каспазы-3 и аутофагии; комплексный анализ клеточного старения при помощи оценки ассоциированной со старением β -галактозидазы, фокусов белков репарации ДНК и доли Ki-67 негативных клеток; анализ репродуктивной гибели клеток при помощи клоногенного теста; математические и статистические методы анализа и обработки полученных данных.

Достоверность обеспечена большим объемом экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования, приборов и оборудования, общепринятых измерительных методик с использованием современных программных средств и методов статистической обработки данных.

Личный вклад. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении всех экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, написании статей и тезисов. Большая часть экспериментального исследования выполнена автором лично.

Апробация работы. Результаты исследования были представлены в виде научных докладов на следующих российских и международных научных конференциях: Ежегодная XXVI конференция ФИЦ ХФ отдела ОДХиБП. Москва, 2021; Ежегодная XXVII конференция ФИЦ ХФ отдела ОДХиБП. Москва, 2022; Ежегодная XXVIII конференция ФИЦ ХФ отдела ОДХиБП. Москва, 2023; Ежегодная XXIX конференция ФИЦ ХФ отдела ОДХиБП. Москва, 2024; IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции». Москва, 2022; X Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции». Москва, 2024; XXXIV Симпозиум «Современная химическая физика». Туапсе, 2022; XXXV Симпозиум «Современная химическая физика». Туапсе, 2023; OpenBio-2022. Новосибирск, 2022; Актуальные проблемы радиационной биологии. К 60-летию создания Научного совета РАН по радиобиологии. Дубна, 2022; VII Съезд биофизиков России. Краснодар, 2023; X Всероссийский молодежный научный форум с международным участием Open Science 2023. Гатчина, 2023.

Публикации. Основные материалы работы отражены в 12 публикациях, в том числе 4 статьи в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus и 8 тезисах докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 146 страницах печатного текста и содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, списка сокращений и списка литературы, содержащего 295 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы её цель и основные задачи, показаны научная новизна работы и её практическая значимость, а также изложены положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлен обзор литературы, посвященный следующим вопросам: 1) Роль фибробластов в патогенезе лучевых поражений; 2) Клеточный отклик на образование повреждений ДНК; 3) Исследование фокусов белков репарации ДНК; 4) Радиационно-индуцированное клеточное старение и клеточная гибель. Из анализа литературы следует, что особенности пострадиационных количественных изменений фокусов белков репарации ДНК и их роль в процессах гибели и старения клеток требуют дальнейшего изучения.

Глава 2. Материалы и методы

Клеточная культура

Для работы использовали культуру фибробластов дермы кожи человека 5-7-го пассажей (Cell Applications, Сан-Диего, Калифорния, США, каталожный номер: 106К-05а). Для культивирования клеток использовали полную питательную среду DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (Thermo Fisher Scientific, США), содержащую 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Thermo Fisher Scientific, США), с добавлением 2 ммоль/л L-глутамина (Thermo Fisher Scientific, США) и 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки культивировали проводили в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37°C, 5% CO₂, насыщенная влажность) со сменой среды один раз в три дня.

Облучение

Клеточные популяции облучали в фазе экспоненциального роста (плотность популяции клеток ~ 60%) на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия). Использовали два режима облучения: 1) для интервала доз от 0,1 до 0,5 Гр мощность дозы составляла 0,04 Гр/мин (напряжение 100 кВ, анодный ток 0,8 мА, фильтр 1,5 мм Al); 2) для интервала доз от 1 до 10 Гр мощность дозы составляла 0,85 Гр/мин (напряжение 200 кВ, анодный ток 5,0 мА, фильтр 1,5 мм Al). Облучение проводили при температуре 4°C. Для поддержания необходимой температуры во время облучения использовали термогранулы LAB ARMOR BEADS.

Иммуоцитохимия

Для фиксации клеток использовали 4% раствор параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) (pH 7,4). Фиксацию проводили в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем препараты дважды промывали PBS с последующей инкубацией в течение 1 ч в 0,3% растворе TritonX-100 в PBS с добавлением 5% сыворотки козы для пермеабиллизации и блокирования неспецифического связывания антител. После этого препараты инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к тем или иным белкам, разведенными в PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA). Использовали следующие первичные антитела: моноклональные антитела кролика к γ H2AX (phospho S139) (разведение 1:800, клон EP854(2)Y, Abcam, США); моноклональные антитела мыши к 53BP1 (разведение 1:400, клон BP13, Merck-Millipore, США); моноклональные антитела мыши к pATM (phospho S1981) (разведение 1:200, клон 10H11.E12, Abcam, США); моноклональные антитела мыши к p-p53 (Ser15) (16G8) (разведение 1:400, Cell signaling, США); моноклональные антитела мыши к белку Ki-67 (разведение 1:400, клон Ki-S5, Merck-Millipore, США); поликлональные антитела кролика к белкам LC3B-I/II (разведение 1:400, кат. № ABC929, Merck-Millipore, США); моноклональные антитела кролика к активной (расщепленной) каспазе-3 (разведение 1:400, кат. № 9664, Cell signaling, США. Затем препараты трижды промывали PBS и инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами IgG (H + L) козы к белкам мыши (Alexa Fluor 488 конъюгированный, 1:1600; Abcam, , США) и IgG H&L козы к белкам кролика (Alexa Fluor ® 555, 1:1600; Abcam, Уолтем, Массачусетс, США) разведенными в PBS, содержащим 1% BSA. Для предотвращения фотовыцветания и окрашивания ДНК клеток использовали монтирующую среду ProLong Gold Medium, содержащую флуоресцентный краситель ДНК - DAPI (Life Technologies, США) в концентрации 1 мкг/мл. Визуализацию иммуоцитохимически-окрашенных клеток проводили с помощью люминесцентного исследовательского микроскопа Nikon Eclipse Ni-U с использованием наборов светофильтров UV-2E/C (340-380 нм возбуждение и 435-485 нм эмиссия) B-2E/C (465-495 нм возбуждение и 515-555 нм эмиссия) и Y-2E/C (540-580 нм возбуждение и 600-660 нм эмиссия). Для документирования микроизображений

использовали камеру высокого разрешения для люминесцентной микроскопии ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Йена, Германия). Случайным образом анализировали не менее 200 клеток на точку. Для подсчета количества фокусов использовали программное обеспечение DARFI (<http://github.com/varnivey/darfi>). Долю Ki-67 негативных, а также каспаза-3 и LC3-II позитивных клеток подсчитывали вручную.

На рис. 1 представлены репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер контрольных и облученных в дозе 10 Гр (24 ч после облучения) клеток.

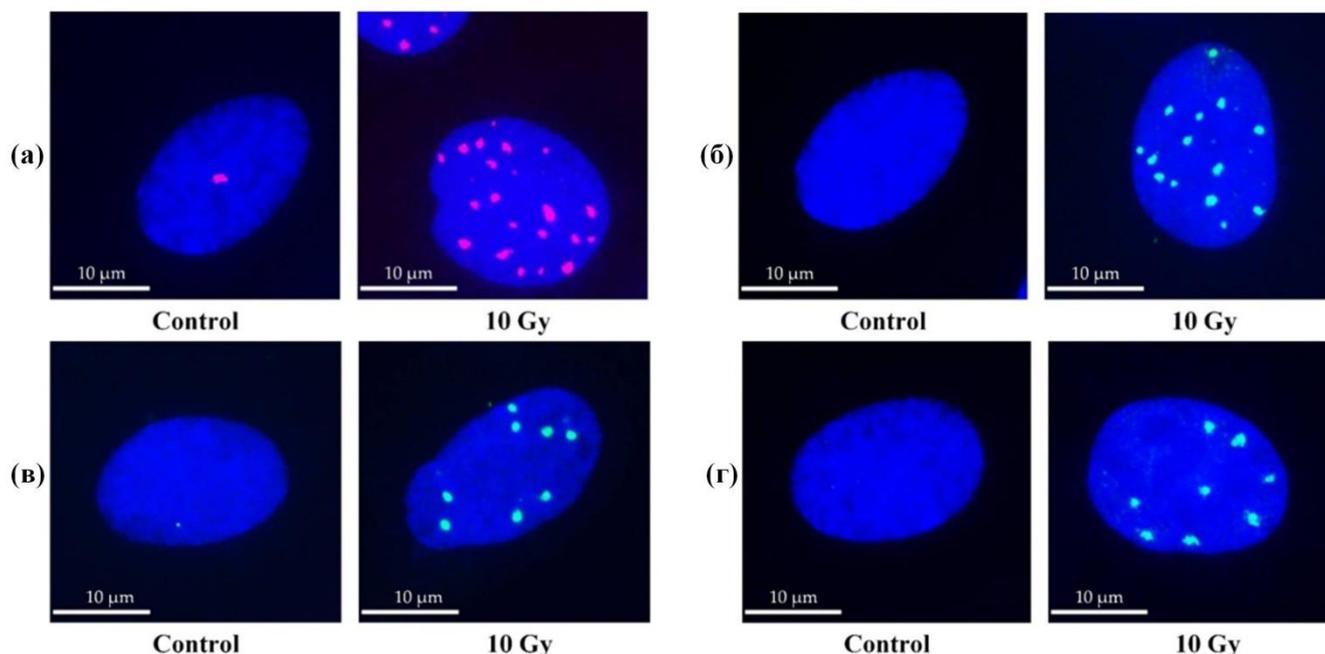


Рисунок 1. Репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер контрольных и облученных в дозе 10 Гр (24 ч после облучения) клеток. Синий – клеточные ядра, окрашенные DAPI. (а) фокусы γ H2AX; (б) фокусы 53BP1; (в) фокусы pATM; (г) фокусы p-p53(Ser-15).

Анализ β -галактозидаза позитивных клеток.

Окраску клеток на β -галактозидазу проводили с использованием набора «Cellular Senescence Assay» (EMD Millipore, USA, Catalog Number: KAA002) согласно протоколу производителя. Дополнительно клеточные ядра окрашивали флуоресцентным красителем ДНК - Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA) в концентрации 1 мкг/мл в PBS (pH 7,4). Дополнительная окраска клеточных ядер помогает значительно улучшить распознавание клеток с низкой активностью β -галактозидазы. Для визуализации микроизображений при комбинированном (проходящем и люминесцентном) освещении использовали инвертированный люминесцентный микроскоп Olympus CKX 41 SF (Olympus, Japan) с объективом 20X и набором светофильтров CKX-U (340-380 нм возбуждение и 435-485 нм эмиссия). Для документирования микроизображений использовали камеру для люминесцентной микроскопии Infinity 3-1 (Lumenera Corp., Canada). Случайным образом анализировали не менее 200 клеток на точку.

Клоногенный анализ

Сразу после облучения клетки ферментативно снимали с культуральных флаконов, подсчитывали их концентрацию и высаживали в чашки Петри (d=60 мм. Corning, США) в концентрации, повышающейся с увеличением дозы излучения. Через 14 суток клеточные колонии фиксировали 100 % метанолом и окрашивали 1% раствором красителя кристаллвиолета. Расчет эффективности посадки и доли выживших клеток проводили по общепринятым формулам (Franken, Rodermond et al. 2006).

Для анализа данных о клоногенной выживаемости использовали стандартную линейно-квадратичную (LQ) модель:

$$SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (1)$$

где SF - доля выживаемости, D – доза облучения (Гр), α и β – линейный и квадратичный эмпирические коэффициенты, соответственно.

Статистический и математический анализ данных

Статистический и математический анализ данных был проведен с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, Талса, Оклахома, США). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартная ошибка (SE). В каждом из экспериментов было три технических параллели. Статистическая значимость была оценена с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни.

Для оценки пороговой дозы полученные наборы данных были проанализированы с использованием модели «hockey stick», позволяющей определить пороговую дозу t_d , за которой следует линейно-зависимое от дозы увеличение эффекта [226]. Функция имеет вид $y(d) = a + b \times (d - t_d) \times 1[d > t_d]$, где d – доза облучения. Проверка оценки параметров a , b и t_d с соответствующими 95 % доверительными интервалами (CI) и стандартной ошибкой (SE) была проведена с использованием программного обеспечения Wolfram Mathematica 13.0.

Глава 3. Результаты

3.1. Дозовые зависимости изменений количества фокусов белков репарации ДНК в ранний период (0,5 и 4 ч) после облучения

На первом этапе работы были изучены зависимости между дозой рентгеновского излучения и количеством радиационно-индуцированных фокусов через 0,5 и 4 ч после облучения клеток в дозах от 0,1 до 5 Гр. Выбор этих временных точек был обусловлен тем, что для наиболее хорошо изученных фокусов γ H2AX и 53BP1, 0,5 ч после облучения является точкой максимума (Asaithamby and Chen 2009, Osipov, Pustovalova et al. 2015, Belov, Chigasova et al. 2023), тогда как через 4 ч после облучения количество фокусов этих белков снижается примерно в 2 раза (Asaithamby and Chen 2009, Osipov, Pustovalova et al. 2015, Belov, Chigasova et al. 2023), что, как правило, связывают с окончанием «быстрой» фазы репарации ДР ДНК (Asaithamby and Chen 2009, Osipov, Pustovalova et al. 2015, Belov, Chigasova et al. 2023).

Полученные данные показали, что через 0,5 ч после облучения в диапазоне доз от 0,1 до 1 Гр наблюдается дозозависимое увеличение количества фокусов γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) (рис. 2). В этом диапазоне доз зависимости доза-эффект хорошо аппроксимируются линейными уравнениями, где y - количество фокусов, x - доза в Гр:

γ H2AX – $y = 30,83x + 3,41$ ($R^2 = 0,99$); 53BP1 – $y = 26,40x + 2,72$ ($R^2 = 0,99$); pATM – $y = 20,89x + 2,18$ ($R^2 = 0,98$); p-p53(Ser-15) – $y = 16,39x + 0,01$ ($R^2 = 0,99$).

Угловым коэффициентом показывает изменение количества фокусов на единицу дозы (Гр). Таким образом, в диапазоне доз от 0,1 до 1 Гр количественный выход радиационно-индуцированных фокусов составил 30,83; 26,40; 20,89 и 16,39 фокусов на клетку в Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15), соответственно. Значения, полученные для наиболее хорошо изученных фокусов белков γ H2AX, 53BP1, pATM, хорошо согласуются с литературными данными (Granzotto, Benadjaoud et al. 2016, Grekhova, Pustovalova et al. 2020, Chai, Kong et al. 2023).

При увеличении дозы облучения до 2 и 5 Гр наблюдалось снижение количественного выхода радиационно-индуцированных фокусов (рис. 2). После облучения в дозе 2 Гр количественный выход фокусов составил 21,84; 17,66; 14,71 и 11,31 фокуса на клетку на 1 Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15), соответственно. После облучения в дозе 5 Гр

количественный выход фокусов составил всего 11,75; 10,36; 7,07 и 4,92 фокуса на клетку на 1 Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15), соответственно.

При инкубации клеток в течение 4 часов после обучения в диапазоне доз от 0,1 до 1 Гр количество фокусов γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) также линейно зависит от дозы (графики представлены в диссертации). В этом диапазоне доз количественный выход радиационно-индуцированных фокусов составил 14,00; 12,69; 11,96 и 16,26 фокусов на клетку на 1 Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) соответственно. После облучения в дозе 2 Гр количественный выход фокусов составил 10,55; 9,27; 7,52 и 11,78 фокуса на клетку на 1 Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15), соответственно. А после облучения в дозе 5 Гр количественный выход фокусов составил всего 7,45; 6,45; 4,49 и 5,51 фокуса на клетку на 1 Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15), соответственно.

Снижение количественного выхода фокусов после облучения в дозах выше 1 Гр может быть отражением как биологических процессов (слиянием отдельнолежащих фокусов с образованием более крупных «центров» репарации или увеличением скорости репарации ДНК в ущерб ее корректности), так и несовершенством использованной нами 2D микроскопии.

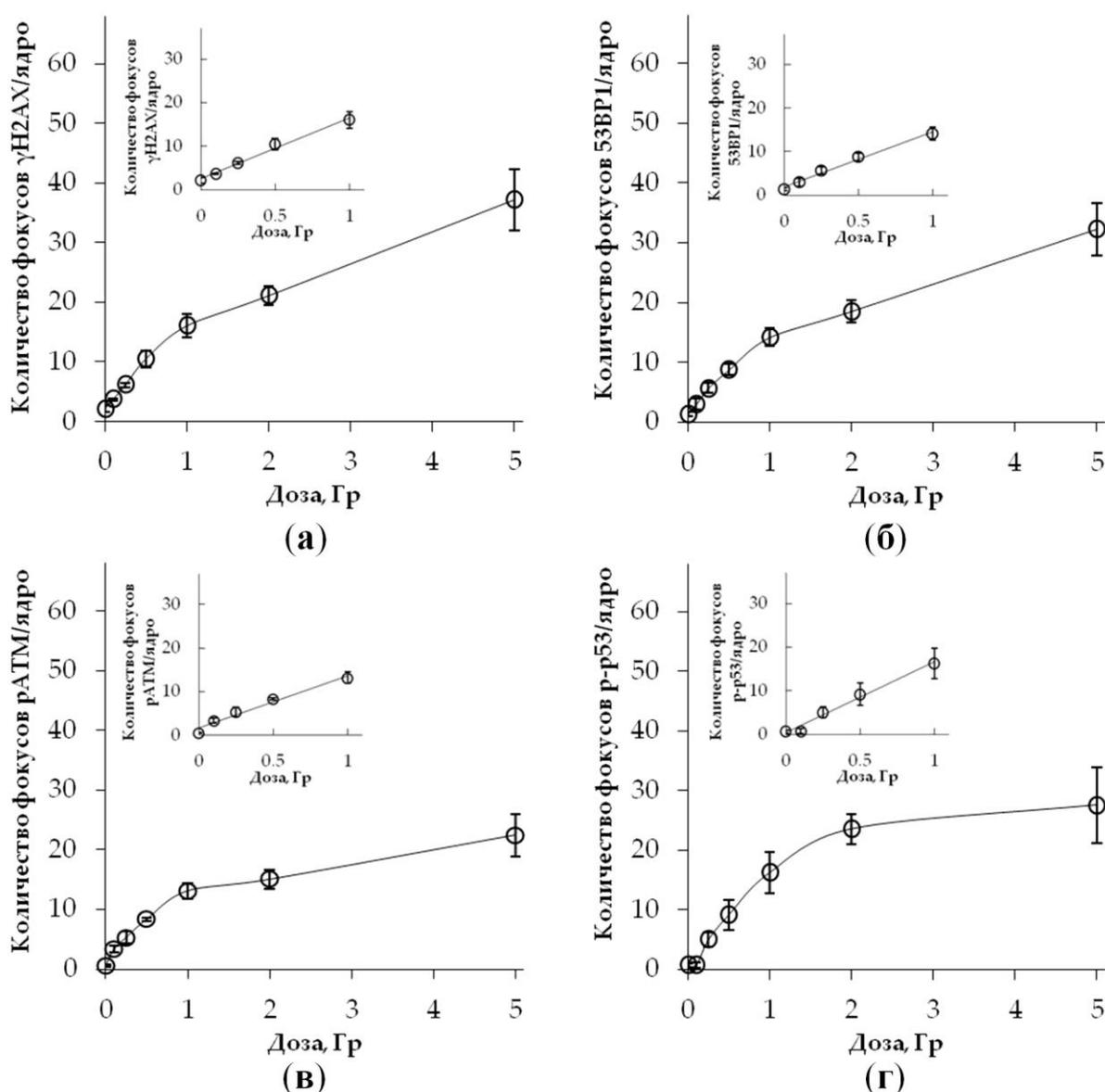


Рисунок 2. Дозовые зависимости для фокусов репарации ДНК, подсчитанных через 0,5 ч после облучения: (а) γ H2AX; (б) 53BP1; (в) pATM; (г) p-p53(Ser-15). Данные представлены в виде средних значений трех независимых экспериментов \pm SE.

3.2. Дозовые зависимости изменений количества остаточных фокусов белков репарации ДНК через 24-72 ч после облучения

Через 24 ч после облучения основные процессы репарации ДНК заканчиваются и остается лишь незначительное количество от первичных радиационно-индуцированных ДР ДНК. Изучение таких остаточных повреждений ДНК представляет особый интерес для радиационной биологии, так как они приводят к гибели или потере репродуктивной способности клетки. В настоящей работе было проведено исследование зависимостей изменений количества остаточных фокусов белков репарации ДНК через 24-72 ч после облучения фибробластов в широком диапазоне доз (от 0,1 до 10 Гр). Для описания полученных зависимостей доза-эффект использовали две популярных в радиобиологии математических модели: 1) линейную беспороговую; 2) пороговую модель «hockey stick» ("хоккейная клюшка").

3.2.1. Линейная беспороговая модель

Линейная беспороговая модель является наиболее простой математической моделью для описания количественных зависимостей изменения эффекта от дозы излучения. Традиционно ее используют для описания дозовых зависимостей стохастических эффектов облучения (Laurier, Billarand et al. 2023). Несмотря на серьезные споры о правомочности использования этой модели оценки риска радиационного канцерогенеза (Calabrese 2022, Selby and Calabrese 2023), она, во многом в силу своей простоты, является базовой для регулирующих органов (МКРЗ, НКДР и т.д.) (Hendry, Niwa et al. 2016). Нами было показано, что изменения количества остаточных фокусов белков репарации ДНК от дозы рентгеновского излучения довольно хорошо описываются линейной функцией.

В частности, зависимости доза-эффект для остаточных фокусов γ H2AX через 24, 48 и 72 ч после облучения аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов γ H2AX, x – доза в Гр: $y = 1,76x + 1,50$ ($R^2 = 0,96$), $y = 1,13x + 0,71$ ($R^2 = 0,99$) и $y = 0,92x + 0,65$ ($R^2 = 0,99$), соответственно (рис. 3 (а)). Видно, что период с 24 до 72 ч количество фокусов продолжает снижаться. Это может свидетельствовать как об окончании процесса репарации ДНК, так и о гибели клетки. В период с 24 по 72 ч количественный выход остаточных фокусов уменьшается в $\sim 1,9$ раза. Наиболее значительное снижение (\sim в 1,6 раза) количественного выхода остаточных фокусов γ H2AX происходит в период от 24 до 48 ч после облучения. После этого, с 48 по 72 ч, количественный выход остаточных фокусов уменьшается не так существенно (\sim в 1,2 раза).

Для фокусов 53BP1 (рис. 3 (б)) зависимости доза-эффект через 24, 48 и 72 ч после облучения аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов 53BP1, x – доза в Гр: $y = 1,31x + 1,05$ ($R^2 = 0,97$), $y = 0,97x + 0,61$ ($R^2 = 0,99$) и $y = 0,76x + 0,45$ ($R^2 = 0,99$), соответственно. В период с 24 по 72 ч отмечается уменьшение количества остаточных фокусов в $\sim 1,7$ раза.

На рис. 3 (в) представлены изменения количества остаточных фокусов pATM после облучения в дозах 0,1-10 Гр. Зависимости доза-эффект через 24, 48 и 72 ч после облучения, описываются линейными уравнениями, где y – количество фокусов pATM, x – доза в Гр: $y = 0,99x + 0,47$ ($R^2 = 0,97$), $y = 0,90x + 0,27$ ($R^2 = 0,98$) и $y = 0,62x + 0,36$ ($R^2 = 0,99$), соответственно. Видно, что в период от 24 до 72 ч после облучения наблюдается снижение количественного выхода остаточных фокусов \sim в 1,6 раза.

Для фокусов p-p53(Ser-15) зависимости доза-эффект через 24, 48 и 72 ч после облучения, аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов p-p53(Ser-15), x – доза в Гр: $y = 0,90x + 0,67$ ($R^2 = 0,86$), $y = 0,76x + 0,34$ ($R^2 = 0,91$) и $y = 0,58x + 0,27$ ($R^2 = 0,97$), соответственно (рис 3 (г)). С увеличением времени после облучения количественный выход фокусов p-p53(Ser-15) уменьшается в период с 24 до 72ч \sim в 1,6 раза.

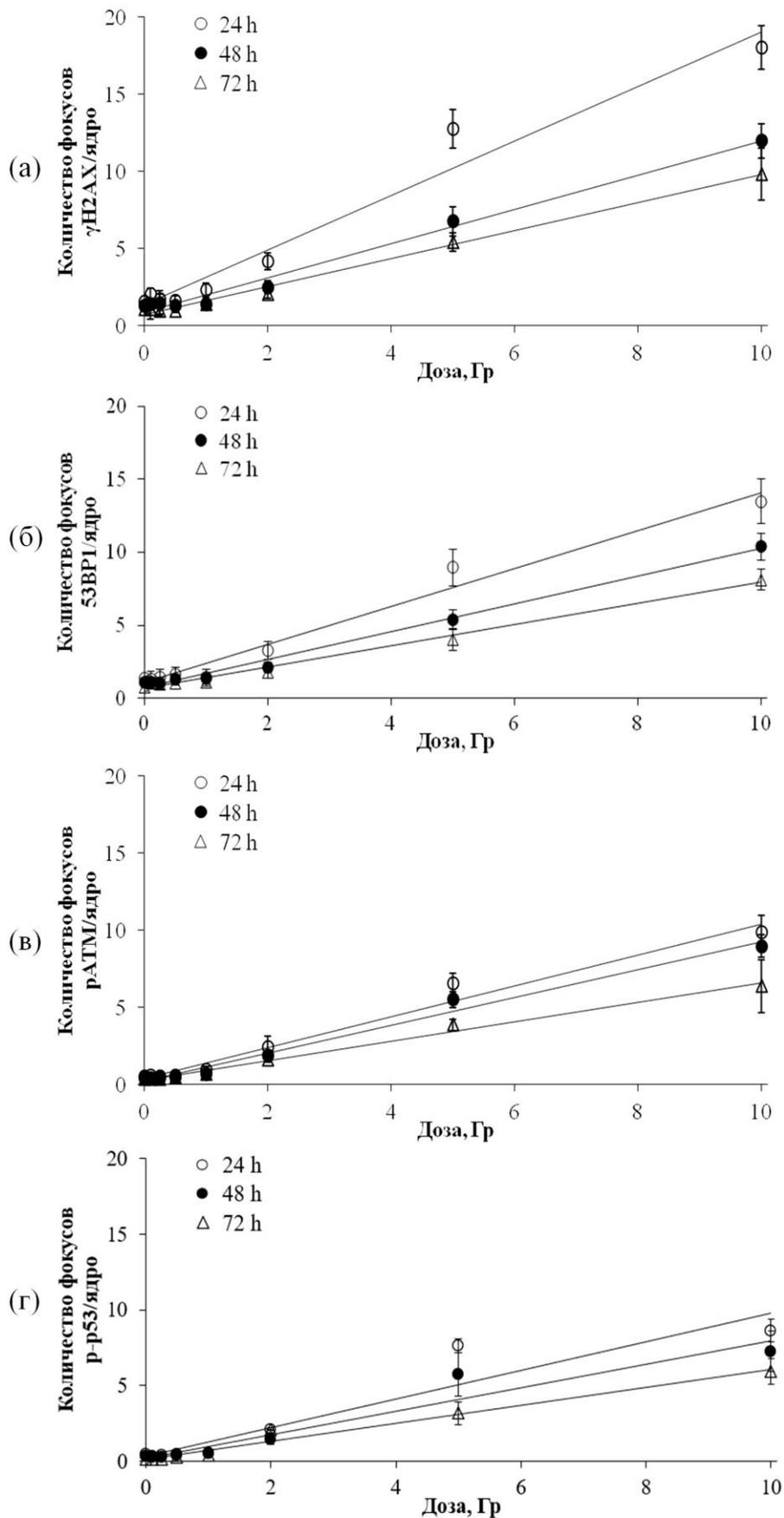


Рисунок 3. Зависимости изменений количества фокусов белков репарации ДНК в фибробластах человека от поглощенной дозы, полученные через 24, 48 и 72 часа после облучения: (а) γ H2AX; (б) 53BP1; (в) pATM; (г) p-p53(Ser-15). Данные представлены в виде средних значений трех независимых экспериментов \pm SE.

В таблице 1 представлен количественный выход остаточных фокусов на единицу поглощенной дозы (фокусы/клетка на 1 Гр). По количественному выходу остаточных фокусов исследованные белки можно расположить в порядке убывания: $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM} \geq \text{p-p53(Ser-15)}$.

Таблица 1. Выход остаточных фокусов белков репарации ДНК, на единицу поглощенной дозы (фокусы/клетка на 1 Гр) через 24, 48 и 72 ч после облучения в дозах 0,1-5 Гр.

Белок	Время после облучения, ч		
	24	48	72
γH2AX	1,76±0,20	1,13±0,07	0,92±0,05
53BP1	1,31±0,13	0,97±0,05	0,76±0,03
pATM	0,99±0,10	0,90±0,07	0,62±0,04
p-p53	0,90±0,21	0,76±0,14	0,58±0,06

3.2.2. Пороговая модель «hockey stick»

Вопрос наличия дозового порога для тех или иных биологических эффектов облучения является одним из значимых и дискутируемых вопросов радиационной биологии. Поэтому важно было оценить наличие возможного порога для остаточных фокусов белков репарации ДНК. Для этой цели нами была использована модель «hockey stick» (Lutz and Lutz 2009). Расчетные значения пороговых доз для остаточных фокусов γH2AX , 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) суммированы в таблице 2. Наличие статистически значимого дозового порога было показано только для остаточных фокусов γH2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения.

Таблица 2. Пороговые дозы (Гр) для остаточных фокусов γH2AX , 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) через 24, 48 и 72 ч после облучения, полученные с помощью «hockey stick» модели.

Белок	Время после облучения, ч		
	24	48	72
γH2AX	0,39±0,63	0,86±0,20 **	0,66±0,17 *
53BP1	0,38±0,09	0,87±0,16 ***	1,05±0,19 **
pATM	0,21±0,55	0,34±0,38	0,21±0,34
p-p53	0,10±1,54	0,23±0,96	0,02±0,72

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$

Дозовые зависимости для фокусов γH2AX и 53BP1, полученные через 48 ч и 72 ч после облучения, показаны на рис. 4 и 5, соответственно.

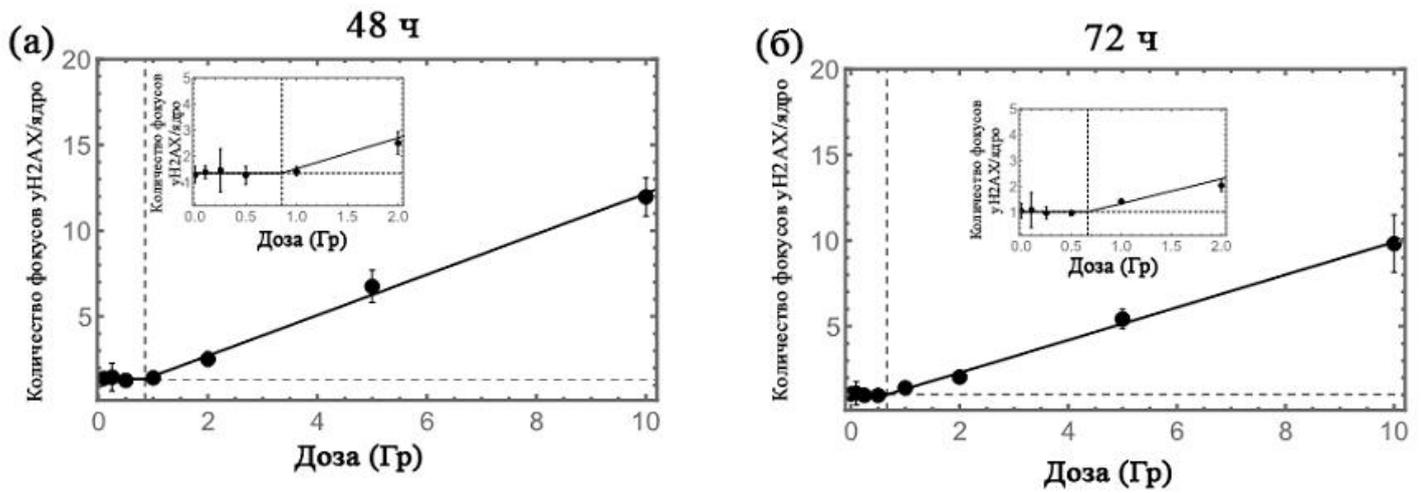


Рисунок 4. Дозовые зависимости для остаточных фокусов γH2AX , подсчитанных (а) через 48 ч и (б) через 72 ч после облучения (средние значения трех независимых экспериментов \pm SE), и графики, сгенерированные с помощью модели «hockey stick» для анализа экспериментально полученных наборов данных (сплошные линии). Пересечение пунктирных линий указывает точку, где кривые зависимости доза-эффект переключаются с «плато» на линейно зависящие от дозы.

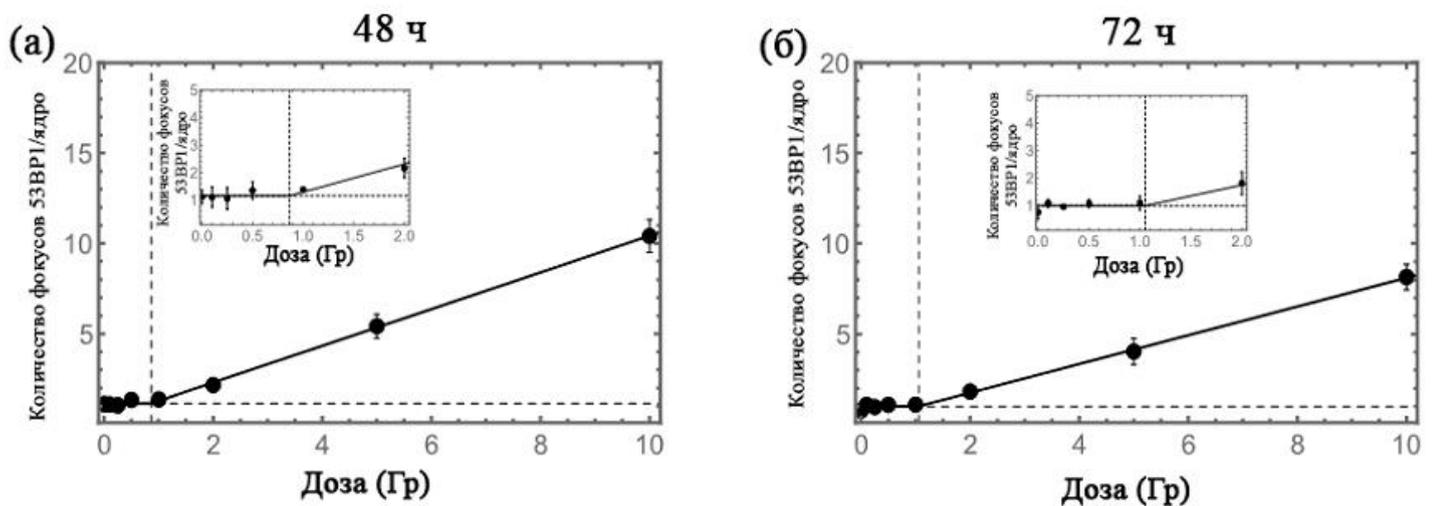


Рисунок 5. Дозовые зависимости для остаточных фокусов 53BP1, подсчитанных (а) через 48 ч и (б) через 72 ч после облучения (средние значения трех независимых экспериментов \pm SE), и графики, сгенерированные с помощью модели «hockey stick» для анализа экспериментально полученных наборов данных (сплошные линии). Пересечение пунктирных линий указывает точку, где кривые зависимости доза-эффект переключаются с «плато» на линейно зависящие от дозы.

3.2.3. Колокализация остаточных фокусов белков репарации ДНК

Дозозависимые изменения количества остаточных фокусов 53BP1, pATM, и p-p53 (Ser-15), колокализованных с остаточными фокусами γH2AX , близки к зависимостям, полученным при подсчете фокусов без учета совместной локализации с γH2AX . Однако количественный выход колокализованных фокусов был несколько ниже (таблица 3). Через 24 ч после облучения \sim 65-70% фокусов γH2AX были колокализованы с фокусами 53BP1, тогда как через 48 и 72 ч эти значения составляли около 70-80%. Характер изменений доли колокализованных фокусов γH2AX с фокусами pATM и p-p53(Ser-15) был сходным.

Через 24 ч после облучения только 45-50% фокусов γ H2AX были колокализированы с фокусами pATM или p-p53(Ser-15), но при снижении пролиферативной активности через 48 и 72 ч после облучения до 60-70% фокусов γ H2AX были колокализированы с фокусами pATM или p-p53(Ser-15).

Таблица 3. Выход фокусов 53BP1, pATM, и p-p53(Ser-15), колокализированных совместно с фокусами γ H2AX, на единицу поглощенной дозы (фокусы/клетка на 1 Гр) через 24, 48 и 72 ч после воздействия рентгеновского излучения.

Белок	Время после облучения, ч		
	24	48	72
53BP1	1,20±0,12	0,89±0,05	0,69±0,03
pATM	0,88±0,08	0,82±0,04	0,57±0,04
p-p53	0,80±0,13	0,73±0,08	0,51±0,04

3.3. Связь остаточных фокусов белков репарации ДНК с клеточными эффектами через 24-72 ч после облучения

3.3.1. Изменения доли СА- β -галактозидаза позитивных клеток

Для оценки изменений доли стареющих клеток в облученных клетках был проведен анализ β -галактозидазы, ассоциированной со старением (СА- β -галактозидаза). Этот фермент обычно используется в качестве маркера клеточного старения, поскольку его экспрессия существенно повышена в стареющих клетках (Maier, Westendorp et al. 2007, Pustovalova, Astrelina capital Te et al. 2017).

Результаты представлены на рис. 6. Было показано, что воздействие рентгеновского излучения приводит к дозозависимому увеличению доли стареющих СА- β -галактозидаза позитивных клеток уже через 24 ч после воздействия. С увеличением времени постлучевой инкубации клеток до 72 ч доля стареющих фибробластов также увеличивалась.

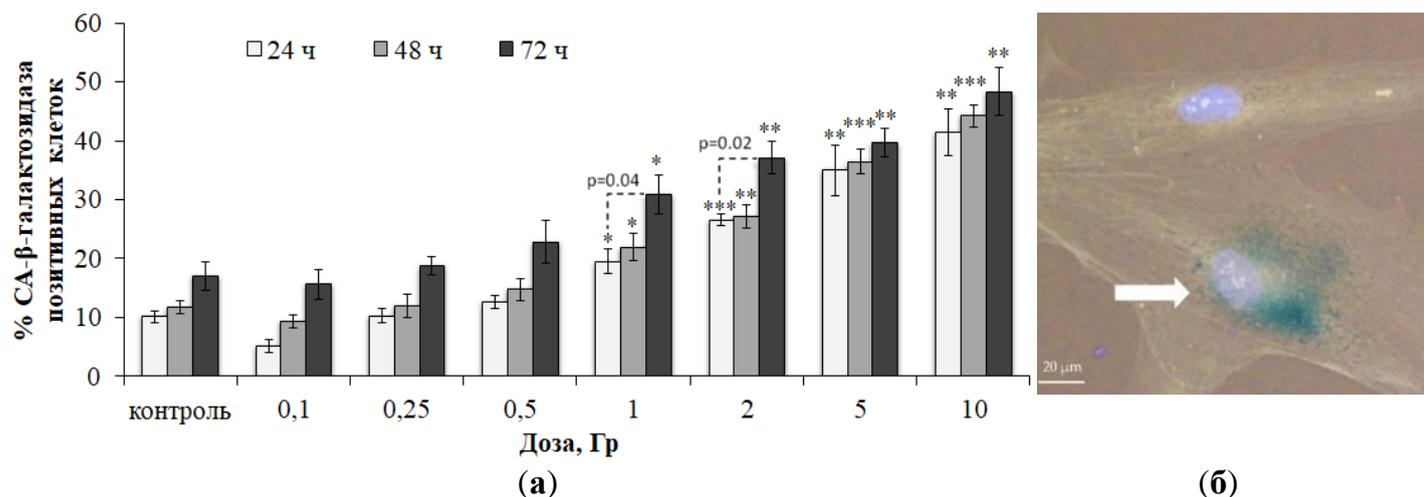


Рисунок 6. (а) Изменения доли стареющих клеток (СА- β -галактозидаза позитивных) в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения в различных дозах. Данные представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ – значимость различий по сравнению с соответствующим контролем. (б) Репрезентативная микрофотография СА- β -галактозидаза позитивной клетки с цитоплазмой, окрашенной в зелено-синий цвет (отмечена белой стрелкой). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 в голубой цвет.

Зависимости доза-эффект через 24 и 48 ч после облучения могут быть аппроксимированы линейными уравнениями, где y – доля СА- β -галактозидаза позитивных клеток, x – доза в Гр: $y = 2,84x + 16,32$ ($R^2 = 0,85$) и $y = 2,94x + 17,75$ ($R^2 = 0,88$), соответственно. Через 72 ч было отмечено линейное увеличение доли СА- β -галактозидаза позитивных клеток при дозах до 2 Гр, после чего наблюдался эффект «насыщения».

3.3.2. Изменения доли Ki-67 негативных клеток

На рис. 7 представлены результаты определения доли Ki-67 негативных клеток в популяциях контрольных и облученных фибробластов. Белок Ki-67 экспрессируется в клетках во время интерфазы (с максимумом в фазах S и G2) и митоза (M) и практически отсутствует в покоящихся и стареющих клетках (Sobecki, Mrouj et al. 2016, Miller, Min et al. 2018). Было показано, что Ki-67 участвует в биогенезе рибосом, организации гетерохроматина и сегрегации митотических хромосом (Sobecki, Mrouj et al. 2016, Sobecki, Mrouj et al. 2017). Анализ изменений доли Ki-67 негативных клеток в контрольной группе показал, что с увеличением времени инкубации их количество увеличивается за счет роста популяции клеток и контактного ингибирования пролиферации (рис. 7). Необходимо отметить, что клетки высевали за 24 ч до облучения, то есть для контрольных популяций клеток прошло 48, 72 и 96 ч. К 96 ч инкубации клетки прекращают экспоненциальный рост и прекращают делиться. Облучение клеток вызывает дозозависимое снижение пролиферативной активности из-за остановки клеточного цикла и потери способности к делению. Наиболее выраженный эффект наблюдался через 72 ч после облучения. Линейное увеличение доли Ki-67 негативных клеток после облучения было отмечено при дозах до 5 Гр через 24 и 48 ч и до 2 Гр через 72 ч, после чего наблюдался эффект «насыщения» (рис. 7). В клетках, облученных в дозе 10 Гр, практически отсутствует пролиферативная активность. В целом, полученные результаты хорошо соотносятся с изменениями доли СА- β -галактозидаза позитивных клеток в популяциях облученных фибробластов.

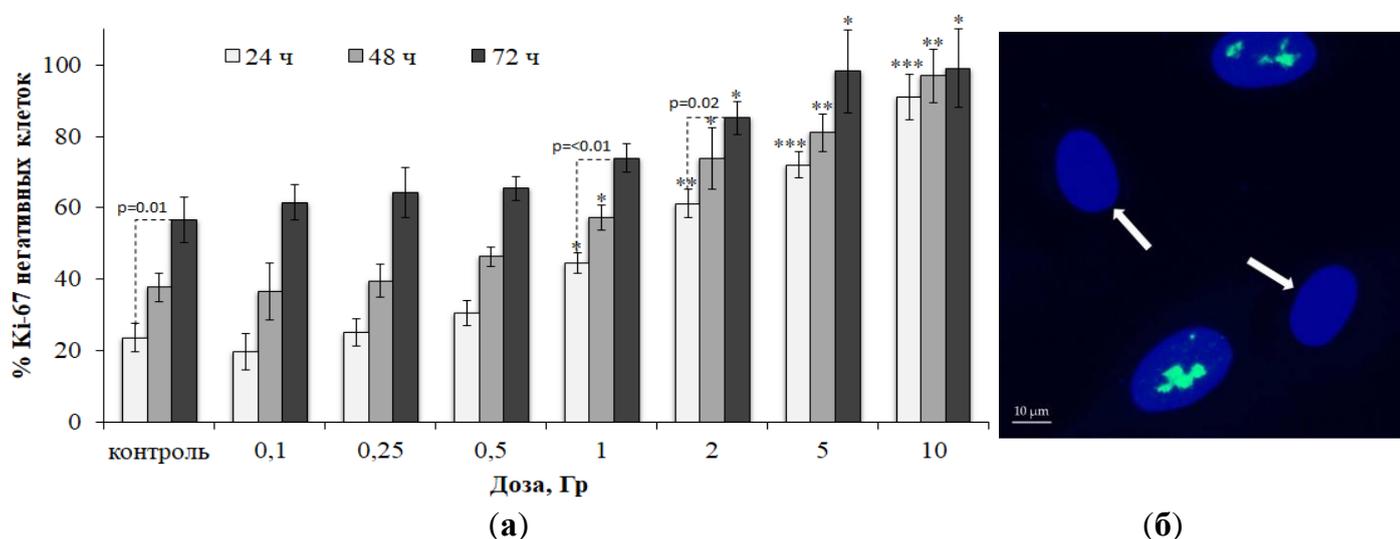


Рисунок 7. (а) Изменения фракции Ki-67 негативных клеток в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения в различных дозах. Данные представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ – значимость различий по сравнению с соответствующим контролем. (б) Репрезентативная микрофотография иммуноцитохимически окрашенных клеток антителами к Ki-67 (зеленый). Ki-67 негативные клетки отмечены стрелками. Ядра окрашены DAPI (синий).

3.3.3. Изменения доли LC3-II позитивных клеток

LC3 является гомологом дрожжевого белка ATG8 у млекопитающих, убиквитиноподобного белка, который становится липидизированным и прочно ассоциируется с аутофagosомальными мембранами. Во время аутофагии цитозольная форма LC3 (LC3-I) конъюгируется с фосфатидилэтаноламином с образованием конъюгата LC3-фосфатидилэтаноламина (LC3-II), который встраивается в мембраны образующихся аутофagosом (Tanida, Ueno et al. 2008).

При иммуноцитохимическом окрашивании на LC3-II аутофagosомы визуализируются в виде точечных (гранулярных/везикулярных) компартментов цитоплазмы, что позволяет легко дифференцировать аутофагические клетки. Результаты анализа изменений доли аутофагических (LC3-II позитивных) клеток в облученных клетках показаны на рис. 8. Было показано, что через 24 и 48 ч после облучения наблюдалось линейное увеличение доли аутофагических клеток в зависимости от поглощенной дозы, с максимумом через 48 ч. Зависимости доза-эффект через 24 и 48 ч после облучения аппроксимируются линейными уравнениями, где y – процент позитивных по LC3-II клеток, x – доза в Гр: $y = 0,98x + 3,66$ ($R^2 = 0,87$) и $y = 1,14x + 5,18$ ($R^2 = 0,88$), соответственно. Через 72 ч после облучения доля аутофагических клеток снижается по сравнению со значениями через 48 ч, и статистически значимые различия по сравнению с контролем отмечаются только после облучения в дозе 10 Гр (рис. 8).

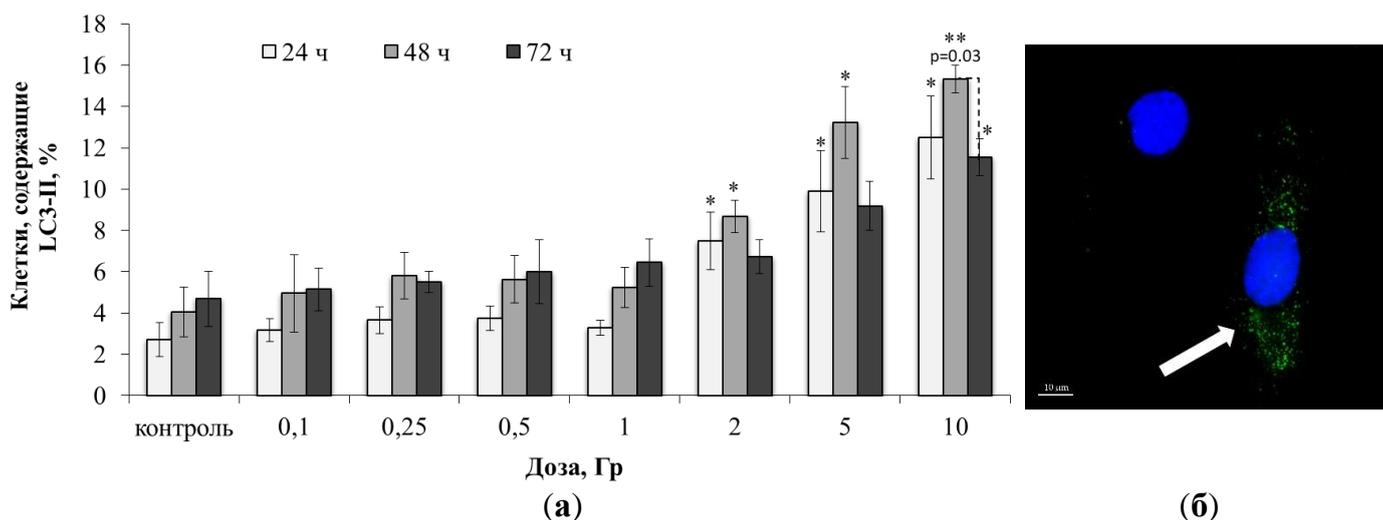
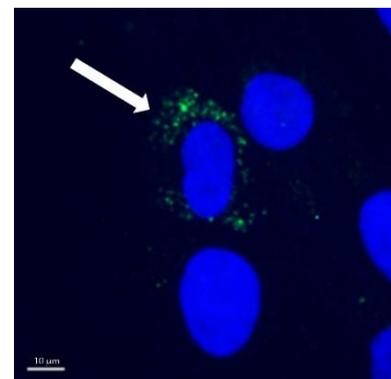
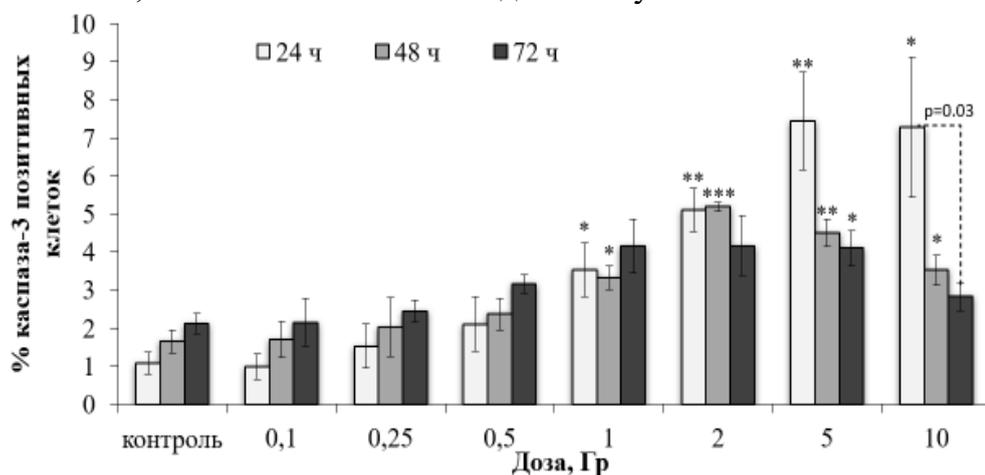


Рисунок 8. (а) Изменения фракции клеток, позитивных по LC3-II, в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения в разных дозах. Данные представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ – значимость различий по сравнению с соответствующим контролем. (б) Репрезентативная микрофотография иммуноцитохимически окрашенных на LC3-II клеток. LC3-II позитивная клетка с пунктатом LC3-II в цитоплазме (зеленый) отмечена стрелкой. Ядра окрашены DAPI (синий).

3.3.4. Изменения доли каспаза-3 позитивных клеток

Эффекторная каспаза-3, принадлежащая к семейству цистеин-аспартатпротеаз (каспаз), широко известна прежде всего благодаря своей важной роли в процессе гибели клеток по механизму апоптоза (Voise and Bouchier-Hayes 2020). Однако функции каспазы-3 гораздо шире, в частности, она важна для регуляции процессов аутофагии (Tsapras and Nezis 2017) и баланса между процессами гибели и старения клеток (Panneer Selvam, Roth et al. 2018). Согласно последним данным, расщепление каспазой-3 специфических белков-мишеней также регулирует прогрессирование клеточного цикла, дифференцировку и онкогенез

(Eskandari and Eaves 2022). Поэтому было важно изучить изменения доли каспаза-3 позитивных клеток в популяциях облученных фибробластов. Как видно из результатов, представленных на рис. 9, дозозависимое увеличение каспаза-3 позитивных клеток было отмечено только через 24 ч после облучения. Через 48 и 72 ч после облучения в дозах 1 и 2 Гр доля каспаза-3 позитивных клеток изменялась незначительно, в то время как после облучения в дозах 5 и 10 Гр отмечалось выраженное снижение доли каспаза-3 позитивных клеток (рис. 9). То есть в эти моменты времени изменение доли клеток, позитивных по каспазе-3, нелинейно зависело от дозы облучения.



(а)

(б)

Рисунок 9. (а) Изменения фракции каспаза-3 позитивных клеток, в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения в разных дозах. Данные представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – значимость различий по сравнению с соответствующим контролем. (б) Репрезентативная микрофотография иммуноцитохимически окрашенных на каспазу-3 клеток. Каспаза-3 позитивная клетка с каспазой-3 в цитоплазме (зеленый) отмечена стрелкой. Ядра окрашены DAPI (синий).

3.3.5. Корреляционный и кластерный анализ

Было показано, что через 24 ч после облучения была отмечена статистически значимая положительная корреляция практически по всем изученным параметрам, за исключением корреляции между количеством фокусов γ H2AX, 53BP1 и pATM и долей каспаза-3 позитивных клеток. Интересно отметить, что существует статистически значимая корреляция между количеством фокусов эффекторного белка p-p53(Ser-15) и долей клеток, позитивных к каспазе-3. Далее, через 48 ч после облучения, корреляционная матрица значительно изменилась: (1) не было обнаружено значимой корреляции между долей клеток, позитивных по каспазе-3, и другими изучаемыми параметрами; (2) не было обнаружено значимой корреляции между количеством фокусов γ H2AX/53BP1 и долей покоящихся Ki-67 негативных клеток. Еще более существенные изменения в корреляционной матрице наблюдались через 72 ч после облучения: (1) по-прежнему отсутствовала значимая корреляция между долей клеток, позитивных по каспазе-3, и другими изучаемыми параметрами. Более того, коэффициенты снизились еще больше, а для фокусов белков DDR даже наблюдалась тенденция к отрицательной корреляции; (2) доля Ki-67 негативных клеток достоверно коррелировала только с долей LC3-II и SA- β -галактозидаза позитивных клеток; (3) доля стареющих клеток, позитивных по SA- β -галактозидазе, коррелировала только с количеством фокусов p-p53(Ser-15), а также с долей позитивных по LC3-II и долей негативных по Ki-67 клеток.

Чтобы понять общую картину взаимосвязи между изменениями изучаемых показателей, показалось интересным провести кластерный анализ с построением иерархического кластерного дерева (рис. 10). Было показано, что наиболее сходными являются изменения в количестве фокусов белков DDR со следующей иерархией в порядке увеличения расстояния: (1) pATM и p-p53(Ser-15); (2) pATM, p-p53(Ser-15) и 53BP1; (3) pATM, p-p53(Ser-15), 53BP1 и γ H2AX; (4) фокусы белков DDR и каспаза-3; (5) белки DDR, каспаза-3 и LC3-II; (6) фокусы белков DDR, каспаза-3, LC3-II и CA- β -галактозидаза; (7) фокусы белков DDR, каспаза-3, LC3-II, CA- β -галактозидаза и Ki-67 (рис. 10). Полученное кластерное дерево наглядно демонстрирует развитие клеточного ответа на облучение через 24-72 ч после облучения фибробластов в дозах 1-10 Гр: невозстановленное и сложное повреждение ДНК индуцирует гибель клеток через механизмы апоптоза и аутофагии, старение и остановку пролиферации.



Рисунок 10. Кластерное дерево для исследуемых показателей в облученных фибробластах человека.

3.4. Клоногенная выживаемость

На рисунке 11 представлены результаты оценки клоногенной выживаемости облученных фибробластов человека. Параметры α и β используемой линейно-квадратичной модели составили $0,46 \pm 0,06 \text{ Гр}^{-1}$ и $0,04 \pm 0,01 \text{ Гр}^{-2}$, соответственно. Доля клеток выживших после облучения в дозе 2 Гр (SF2) составила $0,47 \pm 0,06$. Также были рассчитаны доза, снижающая выживаемость до 37% (D_0), и квазипороговая доза (D_q), соответствующие канонической многоударной модели. D_0 составила $1,20 \pm 0,06 \text{ Гр}$, а $D_q - 0,99 \pm 0,09 \text{ Гр}$.

3.5. Клеточные и молекулярные эффекты в потомках облучённых клеток

Для понимания возможных последствий воздействия ионизирующего излучения для популяций нормальных клеток крайне важны исследования отдаленных эффектов облучения в потомках облученных клеток. В формировании отдаленных эффектов могут быть задействованы различные механизмы, такие как непосредственная трансгенерационная передача повреждений клеточных структур и их генерация *de novo* в результате радиационно-индуцированной нестабильности генома или клеточного старения.

В результате потомки облученных клеток могут преждевременно потерять способность к пролиферации, что тесно связано с радиационно-индуцированным клеточным старением, или онкотрансформироваться.

В ходе настоящей работы было проведена оценка молекулярных и клеточных эффектов в 5, 10 и 15 пассажах после облучения в малой и больших дозах.

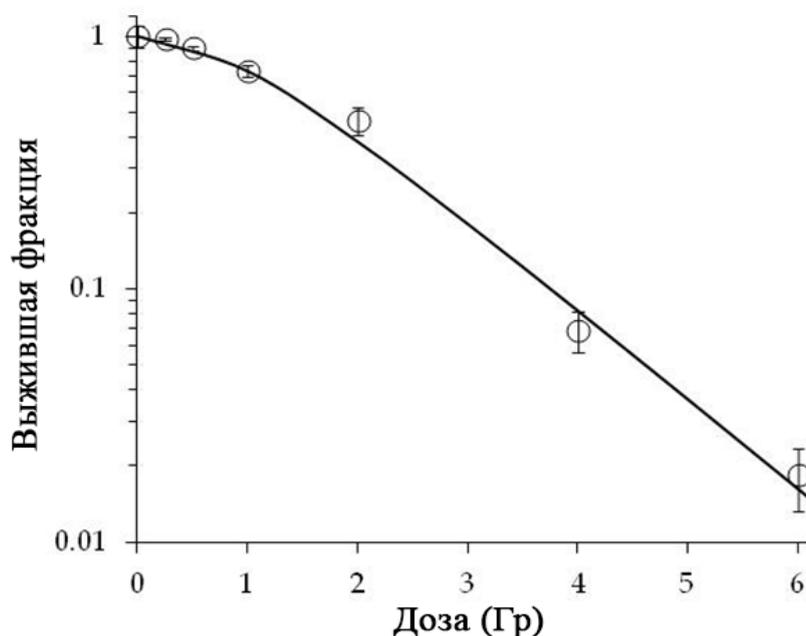


Рисунок 11. Кривая выживаемости фибробластов человека, облученных рентгеновским излучением. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

3.5.1. Фокусы белков репарации ДНК

Результаты оценки количества фокусов γ H2AX в 5, 10 и 15 клеточных пассажах после облучения представлены на рис. 12. Было показано, что на 5 клеточном пассаже статистически значимое по сравнению с контролем повышенное количество фокусов отмечено только после облучения в дозе 5 Гр. Интересно отметить, что в потомках клеток облученных в дозе 5 Гр регистрировалось практически столько же фокусов, что и через 72 ч после облучения (72 ч – $5,4 \pm 0,6$ и 5 пассаж – $4,7 \pm 0,6$ фокуса/ядро, соответственно). Ранее сообщалось, что после облучения в больших дозах фокусы γ H2AX способны передаваться следующей клеточной генерации (проходить через митоз) и служить своеобразным индикатором накопления генетических нарушений (Vaurijoux, Voisin et al. 2017). Другим возможным объяснением может служить передача через пассажи популяции жизнеспособных, но потерявших способность к делению непосредственно облученных клеток. Эти сильноповрежденные клетки с нерепарируемыми повреждениями могут поддерживать высокий уровень фокусов в тотальной популяции клеток.

Нам не удалось провести культивирование клеток облученных в дозе 5 Гр до 10 пассажа вследствие их низкой пролиферативной активности. Поэтому на 10 и 15 клеточных пассажах исследовались только клетки, облученные в дозах 100 и 2000 мГр. На 10 пассаже в потомках облученных клеток не было отмечено статистически значимого повышенного количества фокусов (рис. 12). Однако в 15 клеточном пассаже после облучения в дозе 2 Гр было зарегистрировано статистически значимое повышенное количество фокусов (рис. 12). Можно предположить, что их увеличение вызвано радиационно-индуцированным старением или геномной нестабильностью.

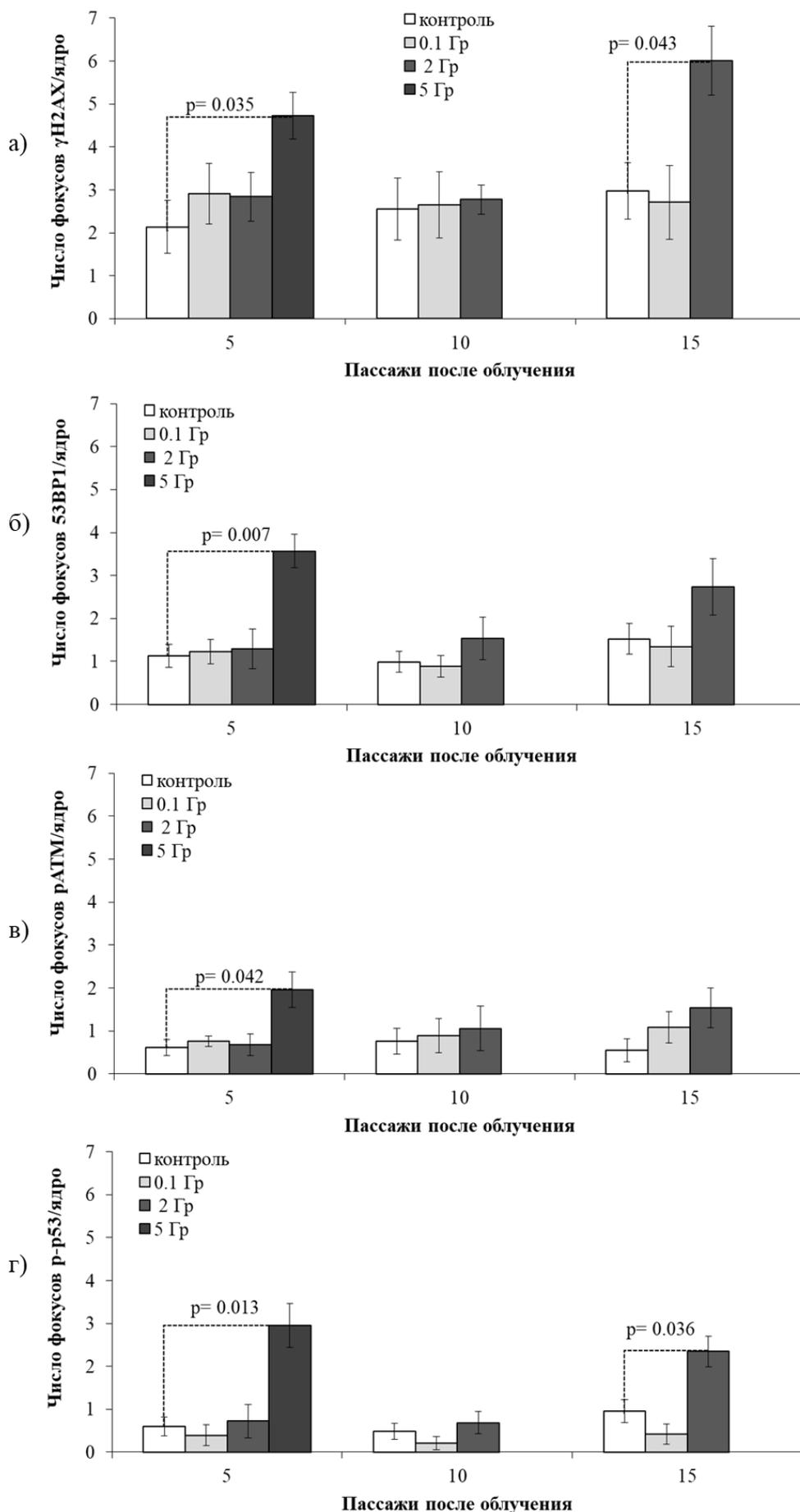


Рисунок 12. Количество фокусов белков репарации ДНК в различных клеточных пассажах после облучения: (а) γ H2AX; (б) 53BP1; (в) pATM; (г) p-p53(Ser-15). Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

Для фокусов 53BP1, как и в случае фокусов γ H2AX на 5 клеточном пассаже после облучения в дозе 5 Гр наблюдалось статистически значимое по сравнению с контролем повышенное количество фокусов 53BP1. При этом их количество значимо не отличалось от количества через 72 ч после облучения (72 ч – $4,0 \pm 0,7$ и 5 пассаж – $3,6 \pm 0,7$ фокуса/ядро, соответственно). После облучения в дозах 0,1 и 2 Гр статистически значимых различий по сравнению с контролем на 5, 10 и 15 пассажах после облучения не отмечалось. Однако стоит отметить тенденцию к повышению количества фокусов на 15 пассаже после облучения в дозе 2 Гр.

Результаты оценки количества фокусов pATM в клеточных пассажах после облучения, сходны с результатами оценки фокусов 53BP1. Также отмечалось статистически значимое повышенное количество фокусов на 5 пассаже после облучения в дозе 5 Гр и тенденция к повышению количества фокусов на 15 пассаже после облучения в дозе 2 Гр.

Изменения количества фокусов p-p53(Ser-15) в клеточных пассажах сходны с результатами, полученными при анализе фокусов γ H2AX. Было отмечено статистически значимое повышенное количество фокусов на 5 пассаже после облучения в дозе 5 Гр и статистически значимое повышенное количество фокусов на 15 пассаже после облучения в дозе 2 Гр (рис. 12).

В целом, результаты исследований свидетельствуют о том, что облучение в малой дозе (0,1 Гр) не приводит к статистически значимому увеличению количества фокусов γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15). После облучения в дозе 5 Гр повышенное количество фокусов всех исследованных белков отмечается на 5 пассаже после облучения. Эффект можно объяснить как трансгенерационной передачей фокусов потомкам облученных клеток через митоз, так и перепассированием непосредственно облученных долгоживущих клеток. Другая картина наблюдается после облучения в дозе 2 Гр. Отсутствие значимых эффектов на 5 и 10 пассажах и повышенное количество фокусов γ H2AX и p-p53(Ser-15) на 15 пассаже, по всей видимости, обусловлено их возникновением *de novo* в результате преждевременного клеточного старения или радиационно-индуцированной нестабильности генома.

3.5.2. Доля СА- β -галактозидаза позитивных клеток

Результаты оценки доли стареющих СА- β -галактозидаза позитивных клеток в различных клеточных пассажах после облучения представлены на рис. 13 (а). Было показано, что воздействие рентгеновского излучения в дозе 5 Гр приводит к сохранению повышенной доли СА- β -галактозидаза позитивных клеток ($45,3 \pm 5,2$ %) вплоть до 5 пассажа после облучения. Здесь необходимо отметить, что доля СА- β -галактозидаза позитивных клеток через 72 ч после облучения составляла $39,7 \pm 2,5$ %. То есть несмотря на довольно большое количество пассажей, доля стареющих клеток практически не менялась. В 5 и 10 клеточных пассажах после облучения в дозе 2 Гр не отмечалось статистически значимого повышения доли СА- β -галактозидаза позитивных клеток. Однако на 15 пассаже отмечается статистически значимое увеличение доли СА- β -галактозидаза позитивных клеток, обусловленное, по всей видимости, преждевременным радиационно-индуцированным старением клеток. Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимого увеличения доли стареющих клеток в пассажах фибробластов, облучённых в дозе 0,1 Гр. Более того, отмечает тенденция к снижению доли стареющих клеток. Возможно, что это связано с положительными эффектами облучения в малых дозах. Ранее было показано, что воздействие гамма-излучения в дозах 30-50 мГр приводило к замедлению старения фибробластов легкого человека HELF-104 в течение всего срока наблюдения (до 20-22 пассажей после облучения) (Velegzhaninov, Ermakova et al. 2018).

3.5.3. Доля Ki-67 негативных клеток

На рис. 13 (б) представлены результаты оценки доли непролиферирующих (покоящихся и стареющих) Ki-67 негативных клеток в 5-15 клеточных пассажах после облучения.

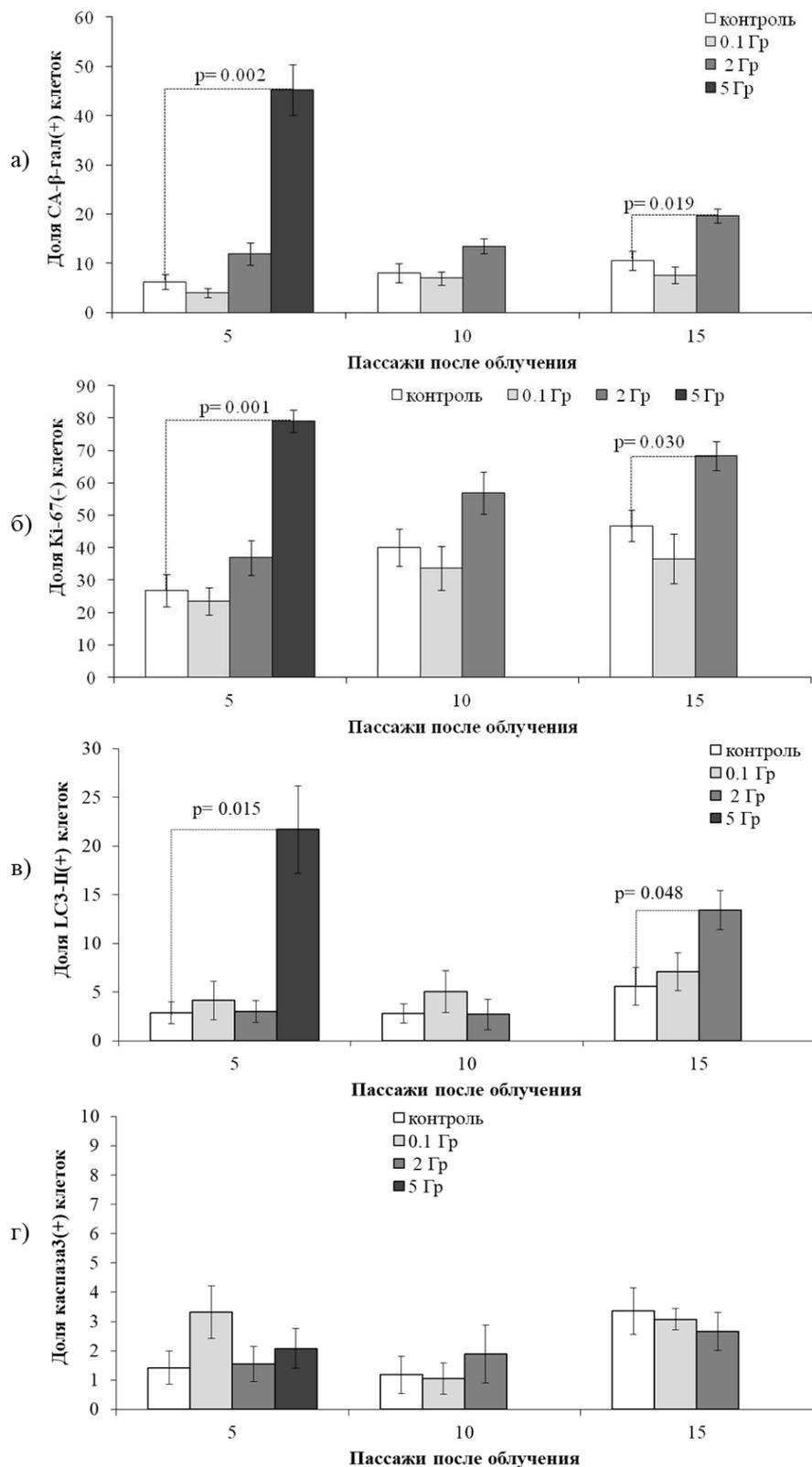


Рисунок 13. Клеточные эффекты в различных клеточных пассажах после облучения: (а) доля СА-β-галактозидаза позитивных клеток; (б) доля Ki-67 негативных клеток; (в) доля LC3-II позитивных клеток; (г) доля каспаза-3 позитивных клеток. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов ± SE.

Было показано, что статистически значимая высокая доля непролиферирующих клеток на 5 пассаже отмечается только после облучения в дозе 5 Гр. Доля Ki-67 негативных клеток достигала $79,0 \pm 3,5$ %. Как уже упоминалось ранее крайне низкая пролиферативная активность клеток, облученных в дозе 5 Гр, вынудила нас ограничить исследования отдаленных эффектов облучения в этой дозе 5 пассажами. После облучения в дозе 2 Гр не было отмечено статистически значимых изменений пролиферативной активности клеток вплоть до клеточного 15 пассажа.

3.5.4. Доля LC3-II позитивных клеток

Результаты исследования изменений доли LC3-II позитивных аутофагических клеток на 5-15 пассажах после облучения представлены на рис. 13 (в). Было показано, что статистически значимые высокие значения доли аутофагических клеток регистрировались только после облучения в дозе 5 Гр на 5 пассаже и после облучения в дозе 2 Гр на 15 клеточном пассаже после облучения.

В целом полученные результаты хорошо соотносятся с результатами оценки стареющих клеток. Известно, что аутофагия не только запускается во время клеточного старения, но и может стимулировать формирование связанного со старением секреторного фенотипа за счет предоставления необходимых для его синтеза молекул (Pantelis, Theocharous et al. 2023).

3.5.5. Доля каспаза-3 позитивных клеток

Анализ доли каспаза-3 позитивных клеток не выявил каких-либо значимых изменений активности каспазы-3 на 5-15 клеточных пассажах после облучения (рис. 13 (г)). По всей видимости, в потомках облученных фибробластов человека доминируют механизмы, связанные с клеточным старением и аутофагией, но не апоптоз. Сообщалось, что устойчивость к апоптозу в стареющих фибробластах человека связана преимущественно со снижением активности каспазы-3 (Marcotte, Lacelle et al. 2004).

В заключении диссертации изложены итоги выполненного исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы, а также

выводы о проделанной работе:

1. Количество фокусов белков γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) в фибробластах человека через 0,5 и 4 ч после воздействия рентгеновского излучения линейно зависит от дозы в диапазоне от 0,1 до 1 Гр, после чего наблюдается эффект «насыщения». Через 0,5 ч после облучения при дозах от 0,1 до 1 Гр количественный выход фокусов белков γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) составлял $30,83 \pm 1,93$; $26,40 \pm 1,71$; $20,89 \pm 1,80$ и $16,39 \pm 0,62$ фокуса/Гр, соответственно.
2. Количественный выход остаточных фокусов белков γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) в фибробластах человека после облучения в дозах 1-10 Гр составлял: через 24 ч – $1,76 \pm 0,20$; $1,31 \pm 0,13$; $0,99 \pm 0,10$; $0,90 \pm 0,21$; через 48 ч – $1,13 \pm 0,07$; $0,97 \pm 0,05$; $0,90 \pm 0,07$; $0,76 \pm 0,14$; через 72 ч – $0,92 \pm 0,05$; $0,76 \pm 0,03$; $0,62 \pm 0,04$; $0,58 \pm 0,06$ фокуса/Гр, соответственно.
3. С использованием «hockey stick» модели показано наличие статистически значимого дозового порога для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения. Пороговая доза для фокусов γ H2AX составляла $0,86 \pm 0,20$ Гр (48 ч) и $0,66 \pm 0,17$ Гр (72 ч). Для фокусов 53BP1 пороговая доза составляла $0,87 \pm 0,16$ Гр (48 ч) и $1,05 \pm 0,19$ (72 ч). Рассчитанные пороговые дозы близки к квазипороговой дозе D_q , характеризующей ширину плечевой области на кривой клоногенной выживаемости облученных фибробластов ($D_q = 0,99 \pm 0,09$ Гр).

4. Дозозависимое увеличение количества остаточных фокусов белков репарации ДНК в фибробластах человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения тесно ассоциировано со снижением пролиферативной активности, аутофагией и клеточным старением.
5. После облучения фибробластов в дозе 5 Гр в 5 клеточном пассаже наблюдается стойкое сохранение повышенного количества остаточных фокусов белков репарации, сопровождающееся низкой пролиферативной активностью и высокой долей стареющих и аутофагических клеток. После облучения в дозе 2 Гр отдаленные негативные эффекты облучения (увеличение количества фокусов γ H2AX и p-p53(Ser-15), а также доли покоящихся, стареющих и аутофагических клеток) были обнаружены только на 15 клеточном пассаже после облучения.
6. Воздействие рентгеновского излучения в малой дозе (0,1 Гр) не приводит к увеличению количества фокусов белков репарации ДНК, снижению пролиферативной активности и клеточному старению на 5-15 клеточных пассажах после облучения.

Основные результаты диссертации изложены в следующих статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus:

1. **Osipov A.A.** Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts. / **A.A. Osipov**, A. Chigasova, E. Yashkina, M. Ignatov, Y. Fedotov, D. Molodtsova, N. Vorobyeva, A.N. Osipov // *Cells*. 2023. V. 12. № 8. pii:1209 (P. 1-19). doi:10.3390/cells12081209 (WoS, JIF 6,0; **Q1**; 2.2 п.л./80%).
2. Belov O. Dose-Dependent Shift in Relative Contribution of Homologous Recombination to DNA Repair after Low-LET Ionizing Radiation Exposure: Empirical Evidence and Numerical Simulation. / O. Belov, A. Chigasova, M. Pustovalova, **A.A. Osipov**, P. Eremin, N. Vorobyeva, A.N. Osipov // *Current Issues in Molecular Biology*. 2023. V. 45. № 9. P. 7352-7373. doi:10.3390/cimb45090465 (WoS, JIF 3,1; **Q2**; 2.5 п.л./40%).
3. Воробьева Н.Ю. Изменения количества остаточных фокусов γ H2AX в Ki-67-позитивных и Ki-67-негативных фибробластах человека, облученных рентгеновским излучением в дозах 2-10 Гр. / Н.Ю. Воробьева, **А.А. Осипов**, А.К. Чигасова, Е.И. Яшкина, А.Н. Осипов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023. Т. 175. № 4. С. 446-450. doi: 10.47056/0365-9615-2023-175-4-446-450 (Vorobyeva N.Y. Changes in the Number of Residual γ H2AX Foci in Ki-67-Positive and Ki-67-Negative Human Fibroblasts Irradiated with X-Rays in Doses of 2-10 Gy. / N.Y. Vorobyeva, **A.A. Osipov**, A.K. Chigasova, E.I. Yashkina, A.N. Osipov // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2023. V. 175. № 4. P. 450-453. doi: 10.1007/s10517-023-05883-2) (WoS, JIF 0,7; **Q3**; 0.5 п.л./70%).
4. **Осипов А.А.** Связь между клеточным старением и изменениями количества и размеров фокусов фосфорилированного гистона H2AX в облученных фибробластах человека. / **А.А. Осипов**, А.К. Чигасова, Е.И. Яшкина, М.А. Игнатов, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2024. Т. 69. No 3. С. 13–18. doi:10.33266/1024-6177-2024-69-3-13-18 (**Osipov A.A.** Link Between Cellular Senescence and Changes in The Number and Size of Phosphorylated Histone H2ax Foci in Irradiated Human Fibroblasts. **Osipov A.A.**, Chigasova A.K., Yashkina E.I., Ignatov M.A., Vorobyeva N.Yu., Osipov A.N. // *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2024. V. 69 № 3. P. 13–18.) (Scopus, SJR 0,18; **Q4**; 0.7 п.л./80%).

Прочие публикации:

5. **Осипов А.А.** Дозовый порог для остаточных фокусов репарации ДНК в фибробластах человека, облученных рентгеновским излучением. / **А.А. Осипов**, А.К. Чигасова, О.В. Белов, Е.И. Яшкина, М.А. Игнатов, Ю.А. Федотов, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // Сборник трудов ХХІХ ежегодной конференции ФИЦ ХФ РАН. Секция:

Динамика химических и биологических процессов. Москва, 2024, с. 83.

6. **Осипов А.А.** Связь между фокусами γ H2AX и клеточным старением в облученных фибробластах человека. / **А.А. Осипов**, А.К. Чигасова, Е.И. Яшкина, М.А. Игнатов, Ю.А. Федотов, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // Химия, физика, биология: пути интеграции. Сборник тезисов докладов X Всероссийской научной молодежной школы-конференции. Москва, 2024. С. 127.

7. **Осипов А.А.** Роль двунитевых разрывов ДНК в радиационно-индуцированном клеточном старении. / **А.А. Осипов**, А.К. Чигасова, Е.И. Яшкина, М.А. Игнатов, Ю.А. Федотов, Д.В. Молодцова, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // VII Съезд биофизиков России. Сборник научных трудов в 2-х томах. Краснодар, 2023. Т. 2. С. 81-82.

8. **Осипов А.А.** Остаточные фокусы белков репарации ДНК: роль в формировании клеточных эффектов облучения. / **А.А. Осипов**, А.К. Чигасова, Е.И. Яшкина, М.А. Игнатов, Ю.А. Федотов, Д.В. Молодцова, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов // Open Science 2023. Сборник тезисов X Всероссийского молодежного научного форума с международным участием. Гатчина, 2023. С. 144.

9. **Осипов А.А.** Особенности репарации радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК в нейральных стволовых клетках. / **А.А. Осипов** // Современная химическая физика. XXXIV Симпозиум. Сборник тезисов. Туапсе, 2022. С. 116.

10. **Осипов А.А.** Количественные изменения фокусов белков репарации ДНК в мезенхимальных стромальных клетках человека при воздействии 3Н-тимидина и тритированной воды. / **А.А. Осипов**, М.В. Пустовалова, А.К. Чигасова, Н.Ю. Воробьева, Д.И. Кабанов, В.Г. Барчуков, О.А. Кочетков, А.Н. Осипов // Актуальные проблемы радиационной биологии: Материалы конференции. Дубна, 2022. С. 91.

11. Блохина Т.М. Сравнительный анализ индукции одностранных разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК в фибробластах кожи человека при воздействии УФ-а и рентгеновского излучений. / Т.М. Блохина, Е.И. Яшкина, **А.А. Осипов**, Н.Ю. Воробьева, В.Л. Зорин, А.И. Зорина, А.Н. Осипов // Современные проблемы общей и космической радиобиологии. Материалы конференции. Дубна, 2017. С. 21.

12. Роднева С.М. Сравнительные количественные исследования фокусов γ H2AX в фибробластах легкого эмбриона человека, инкубированных в средах, содержащих меченные тритием тимидин или аминокислоты. / С.М. Роднева, **А.А. Осипов**, Д.В. Гурьев, А.А. Цишнатти, Ю.А. Федотов, Е.И. Яшкина, Н.Ю. Воробьева, А.А. Максимов, О.А. Кочетков, А.Н. Осипов // VIII Съезд по радиационным исследованиям. Тезисы докладов. Москва, 2021. С. 72.

Благодарности:

Автор выражает благодарность руководителю диссертационной работы, профессору РАН Осипову Андреяну Николаевичу за идеи и поддержку при выполнении диссертационной работы. Выражаю признательность и благодарность доктору биологических наук Посыпановой Галине Ароновне за помощь в освоении лабораторных методик и поддержку в процессе моей научной работы. Также я выражаю благодарность сотрудникам группы радиационной биохимии нуклеиновых кислот ФИЦ ХФ РАН и лаборатории радиационной биофизики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, и в особенности, кандидатам биологических наук Воробьевой Наталье Юрьевне и Чигасовой Анне Константиновне, а также Игнатову Максиму Александровичу, и Яшкиной Елизавете Игоревне за постоянную помощь и поддержку. Особую благодарность хочу выразить кандидату биологических наук Белову Олегу Валерьевичу (ОИЯИ) за помощь в проведении «hockey stick» моделирования.

Исследование было поддержано грантами РФФИ (проекты № 22-2400490 и 23-1400078).