

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., профессор РАН Осипов Андреев Николаевич

Москва - 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Фибробласты и их роль в патогенезе лучевых поражений	14
1.2. Клеточный отклик на образование двунитевых разрывов ДНК.....	21
1.3. Фокусы белков репарации ДНК в радиобиологических исследованиях.....	28
1.4. Радиационно-индуцированная клеточная гибель и клеточное старение	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Клеточная культура.....	45
2.2. Облучение	45
2.3. Иммуноцитохимия	45
2.4. Анализ β -галактозидаза позитивных клеток.	47
2.5. Клоногенный анализ.....	47
2.6. Анализ данных	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	49
3.1. Дозовые зависимости изменений количества фокусов белков репарации ДНК в ранний период (0,5 и 4 ч) после облучения	49
3.2. Дозовые зависимости изменений количества остаточных фокусов белков репарации ДНК через 24-72 ч после облучения.....	54
3.2.1. Линейная беспороговая модель	54
3.2.2. Пороговая модель «hockey stick»	60
3.2.3. Колокализация остаточных фокусов белков репарации ДНК	67
3.3. Связь остаточных фокусов белков репарации ДНК с клеточными эффектами через 24-72 ч после облучения.....	69

3.3.1. Изменения доли СА-β-галактозидаза позитивных клеток.....	69
3.3.2. Изменения доли Ki-67 негативных клеток.....	71
3.3.3. Изменения доли LC3-II позитивных клеток.....	74
3.3.4. Изменения доли каспаза-3 позитивных клеток.....	76
3.3.5. Корреляционный и кластерный анализ	78
3.4. Связь остаточных фокусов белков репарации ДНК с клоногенной выживаемостью	81
3.5. Клеточные и молекулярные эффекты в потомках облучённых клеток .	82
3.5.1. Фокусы белков репарации ДНК	82
3.5.2. Доля СА-β-галактозидаза позитивных клеток	88
3.5.3. Доля Ki-67 негативных клеток	89
3.5.4. Доля LC3-II позитивных клеток	90
3.5.5. Доля каспаза-3 позитивных клеток	91
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	111
БЛАГОДАРНОСТИ	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. 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 [1], утрате способности к делению, старению [2] или, наоборот, активации с избыточной продукцией белков, таких как коллаген и фибронектин [3]. В зависимости от судьбы облучённых фибробластов, могут развиваться различные негативные тканевые эффекты, включая воспаление, фиброз и дисфункцию тканей [4-6].

Среди различных типов радиационно-индуцированных повреждений ДНК, наиболее опасными являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК [7-9]. Точность и эффективность процесса репарации этих повреждений фактически определяют дальнейшую судьбу облучённых клеток: обновление или ограничение пролиферации, старение и гибель [10]. В клетках, которые продолжают делиться, несмотря на ошибки репарации ДНК, увеличивается вероятность онкологической трансформации [11]. Относительно корректная репарация ДНК от ДР по пути гомологичной рекомбинации (англ. homologous recombination – HR) осуществляется с использованием в качестве матрицы ДНК сестринских хроматид во время относительно коротких S и G2 фаз клеточного цикла [12]. В результате большая часть ДР ДНК в облучённой клетке элиминируется с помощью механизма классического негомологичного соединения концов (англ. non-homologous end joining – NHEJ) [12, 13]. Вследствие некорректной репарации ДНК, особенно по альтернативным неканоническим механизмам соединения концов, возникают микроструктурные хромосомные aberrации и различные цитогенетические нарушения (хромосомные aberrации стабильного и

нестабильного типов, а также микроядра). Невозможность элиминации ДР ДНК приводит к инициации механизмов гибели клеток или сенесценции (клеточного старения). Считается, что одной из основных причин нестабильности генома, канцерогенеза и старения является накопление генетических нарушений вследствие некорректной репарации ДНК от ДР [14-16].

Иммуноцитохимический анализ белков, участвующих в отклике клеток на повреждение ДНК (англ. DNA damage response – DDR) позволяет получать уникальную информацию о пострadiационных изменениях количества сайтов репарации ДНК и их распределении по объему ядра каждой клетки [17]. Сотни и тысячи копий этих белков образуют динамические фокальные микроструктуры, локализованные в областях репарации ДНК от ДР. Изначально такие скопления белков называли фокусами, индуцированными ионизирующим излучением (англ. ionizing radiation induced foci – IRIF), но в последнее время чаще используется такие названия как фокусы повреждения ДНК [18, 19] или фокусы белков репарации ДНК [20, 21]. Среди белков, образующих фокусы, наиболее изученными являются H2AX, фосфорилированный по серину 139 (γ H2AX) [22, 23], 53BP1 (p53-связывающий белок 1 – p53-binding protein 1) [24-26] и ATM (мутантный белок при атаксии телеангиэктазии – ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein), фосфорилированный по серину 1981 (pATM) [27, 28].

Вариант корового гистона H2A – H2AX в ответ на образование повреждения ДНК фосфорилируется киназами семейства фосфатидилинозитол-3-киназ: ATM, DNA-ПК (ДНК-зависимая протеинкиназа – DNA-dependent protein kinase) и ATR (атаксия телеангиэктазия и Rad3-родственный белок – ataxia telangiectasia and Rad3-related protein), что приводит к локальному ремоделированию хроматина, амплификации и привлечению белков репарации [29]. Белок 53BP1 играет важную роль в выборе механизма репарации ДНК от ДР и

активации контрольных точек [30-32]. ATM является одной из ключевых киназ-трансдукторов, координирующих DDR путём активации репарации ДНК и различных сигнальных путей. ДР ДНК являются основным триггером активации ATM путём диссоциации от димерной формы посредством аутофосфорилирования по серину 1981 [33]. В последнее время было также показано, что белок p53, фосфорилированный по серину-15, также может образовывать фокусы [34]. Серин 15 (Ser15), фосфорилированный протеинкиназами ATM и ATR, является основной мишенью в p53 в процессе DDR [35]. Фосфорилирование Ser15 также запускает последовательную серию дополнительных событий фосфорилирования в p53 (включая фосфорилирование по Ser9 -20, -46 и Thr18), которые дополнительно способствуют индукции и активации p53 [35, 36]. Дозовые зависимости и пострадиационные изменения фокусов p53, фосфорилированных по серину 15, до сих пор плохо изучены.

В фибробластах человека, облучённых ИИ с низкой линейной передачей энергии (ЛПЭ), например рентгеновским излучением, максимальное количество фокусов γ H2AX, 53BP1 и pATM, наблюдается примерно через 0,25-1 час после облучения [27, 37, 38]. После чего количество радиационно-индуцированных фокусов уменьшается экспоненциально, но при этом даже через 24 часа после облучения может сохраняться небольшое количество фокусов. Такие фокусы в литературе называют остаточными (англ. residual) [21, 39]. Показано, что оценка количества остаточных фокусов γ H2AX может служить прогностическим критерием для радиационно-индуцированной гибели клеток [40, 41]. Повышение количества остаточных фокусов тесно связано со снижением колониобразующей способности [42]. Фокусы γ H2AX и 53BP1 также являются общепринятыми маркерами клеточного старения, поскольку их количество увеличивается в сенесцентных клетках [43-45]. Особенности пострадиационных изменений количества остаточных фокусов белков DDR,

а также их роль в процессах гибели и сенесценции клеток всё ещё недостаточно изучены. Особо спорным является вопрос о роли фокусов белков DDR в формировании отдалённых эффектов облучения. Ведутся дискуссии, обусловлено ли повышение их количества в потомках облучённых клеток трансгенерационной передачей начальных повреждений и ошибками во время митоза или образованием нарушений *de novo* вследствие радиационной нестабильности генома или преждевременного клеточного старения. 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.

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) (эффektor)) 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), 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.

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.

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: $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM} \geq \text{p-p53(Ser-15)}$.

2) Дозозависимое увеличение количества остаточных (через 24-72 ч после облучения) фокусов γH2AX , 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 γH2AX 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.

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.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.1 – Радиобиология по направлениям исследований: П.2. Исследование закономерностей биологического ответа на воздействие ионизирующих излучений и разработка эффективных средств и способов управления радиобиологическими эффектами; П.4. Механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками; П.5. Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны; молекулярные механизмы репарации лучевых

повреждений; механизмы радиационного гормезиса; П.6. Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток; П.7. Фундаментальные и прикладные проблемы дозиметрии радиобиологических эффектов. Количественная оценка биологического действия излучения. Биологическая дозиметрия. Особенности биологического действия малых доз облучения; П.8. Радиационная генетика. Влияние ионизирующих излучений на геном, механизмы репарации ДНК; отдаленные последствия действия ионизирующих излучений на геном растений и животных.

Достоверность результатов 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 автора. 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 результатов. 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.

Объем и структура 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фибробласты и их роль в патогенезе лучевых поражений

Несмотря на то, что фибробласты – это одни из наиболее распространённых клеток в дерме человека и одни из важнейших участников ее регенерации, термин «фибробласт» как тип клеток остается относительно неопределённым. «Фибробластом» называют любую стромальную клетку, которая не экспрессирует маркеры более специфического мезенхимального происхождения [46]. Исходя из этого определения, складывается неправильное представление о фибробластах как об однородных и статичных клетках. Однако фибробласты представляют собой впечатляюще гетерогенную и динамичную клеточную популяцию. Поэтому следует проявлять особую осторожность при определении популяции фибробластов, используемых в экспериментальных исследованиях. Популяции фибробластов различаются в разных тканях человека, причем значительные изменения очевидны даже в пределах одного типа ткани. Например, в разных слоях дермы кожи, содержатся разнообразные субпопуляции фибробластов с уникальной морфологией и физиологическими функциями [47-50]. В зависимости от глубины их расположения в дерме, фибробласты экспрессируют разное количество коллагена и разное соотношение мРНК коллагена I и III типов. Кроме того, фибробласты в более глубоких слоях дермы продуцируют меньше мРНК коллагеназы, чем фибробласты в более поверхностных слоях [51]. В лёгких обычно присутствуют в интерстициальном пространстве, но встроены в фибриллярный внеклеточный матрикс (англ. extracellular matrix – ECM) интерстиция и продуцируют основные компоненты соединительной ткани [52].

Фибробласты удивительно пластичны по своей природе. Они способны изменять свои функции и физиологию или даже трансформироваться в новый тип клеток в зависимости от расположения в организме. Механизмы, приводящие к этим изменениям, всё ещё плохо изучены; однако считается,

что как растворимые сигнальные молекулы, так и резидентный молекулярный каркас внеклеточного микроокружения фибробласта могут влиять на активность и трансформацию фибробласта [53-55]. Клетки, которые имеют мезенхимально-стромальное происхождение, включая адипоциты и перициты, способны также дифференцироваться в фибробласты при соответствующих стимулах [56-59]. Даже клетки эндотелиального и эпителиального происхождения способны приобретать фенотип фибробластов [60-62]. Аналогичным образом, сами фибробласты способны изменять свой клеточный профиль, причем наиболее распространенным является переход в сократительные миофибробласты [63, 64].

Фибробласты кожи, то есть дермальные фибробласты, происходят из мезенхимальных стволовых (стромальных) клеток в слое дермы кожи. Эти клетки неэпителиальные, неиммунные и обычно присутствуют в виде отдельных клеток, а не в скоплениях. Дермальные фибробласты были первыми соматическими клетками человека, которые перепрограммировали в плюрипотентные стволовые клетки [63-65]. Субпопуляции фибробластов располагающиеся в разных слоях дермы обладают специфическими морфологическими и функциональными свойствами [49]. Различают фибробласты сосочкового (папиллярного, выглядящего в виде гребнеобразной структуры поверхностного слоя) и фибробласты сетчатого (ретикулярного) типа, расположенных в глубоком слое дермы состоящего из толстых коллагеновых и эластиновых волокон, расположенных параллельно поверхности кожи [66, 67]. Также отдельно выделяют фибробласты специфичные для волосяных фолликул [66, 67]. Когда эти субпопуляции клеток выделяют и культивируют отдельно в условиях *in vitro*, они демонстрируют отчетливые фенотипические различия [50, 67]. Морфологические признаки тесно ассоциированы со свойствами фибробластов. Так воздействие UVA излучения (ультрафиолет А) может ингибировать полимеризацию актиновых филаментов и индуцировать

морфологические изменения в фибробластах кожи, что приводит к снижению синтеза коллагена [68].

Постмитотический подтип фибробластов обычно имеют классическую веретенообразную морфологию с возможностью плоской полярности. Эти фибробласты считаются пролиферативно неактивными и терминологически определяются как фиброциты (рис.1) [50]. Такие фибробласты имеют много общих черт с мезенхимальными стволовыми клетками и считаются находящимися в покоящемся или дормантном (спящем) состоянии с незначительной транскриптомной активностью [69]. Покоящиеся фибробласты потенциально могут активироваться при воздействии внешних раздражителей, таких как факторы роста [70]. В присутствии трансформирующего фактора роста (TGF)- β 1, β 2 и β 3 фибробласты подвергаются фенотипической дифференцировке, в ходе которой изменяются структура и функция фибробласта. Первоначально TGF- β 1 и TGF- β 2 стимулируют прикрепление фибробластов с помощью структур, содержащих интегрин, к волокнистым белкам ECM. После этого они начинают экспрессировать стрессовые волокна α SMA (англ. α -smooth muscle actin; альфа-актин гладких мышц) или актиновые филаменты в своей цитоплазме [70]. Этот фенотип называется промиофибробластом (рис.1). Такие виды фибробластов не обладают классической морфологией веретенообразной формы с двумя загнутыми концами. Протомиофибробласты подвергаются дальнейшей дифференцировке в присутствии TGF- β 1, TGF- β 2 (либо генерации, либо активации) с образованием «миофибробластов», проявляющих совершенно иную морфологию (рис.1) [71]. Эти миофибробласты в основном характеризуются коллагеновыми волокнами, которые присутствуют в углах клеточной структуры. Фенотипические различия среди популяции фибробластов проявляются главным образом в выработке синтезирующих молекул (компонентов ECM) и выработке секреторных молекул (факторов роста, цитокинов или хемокинов) [72].

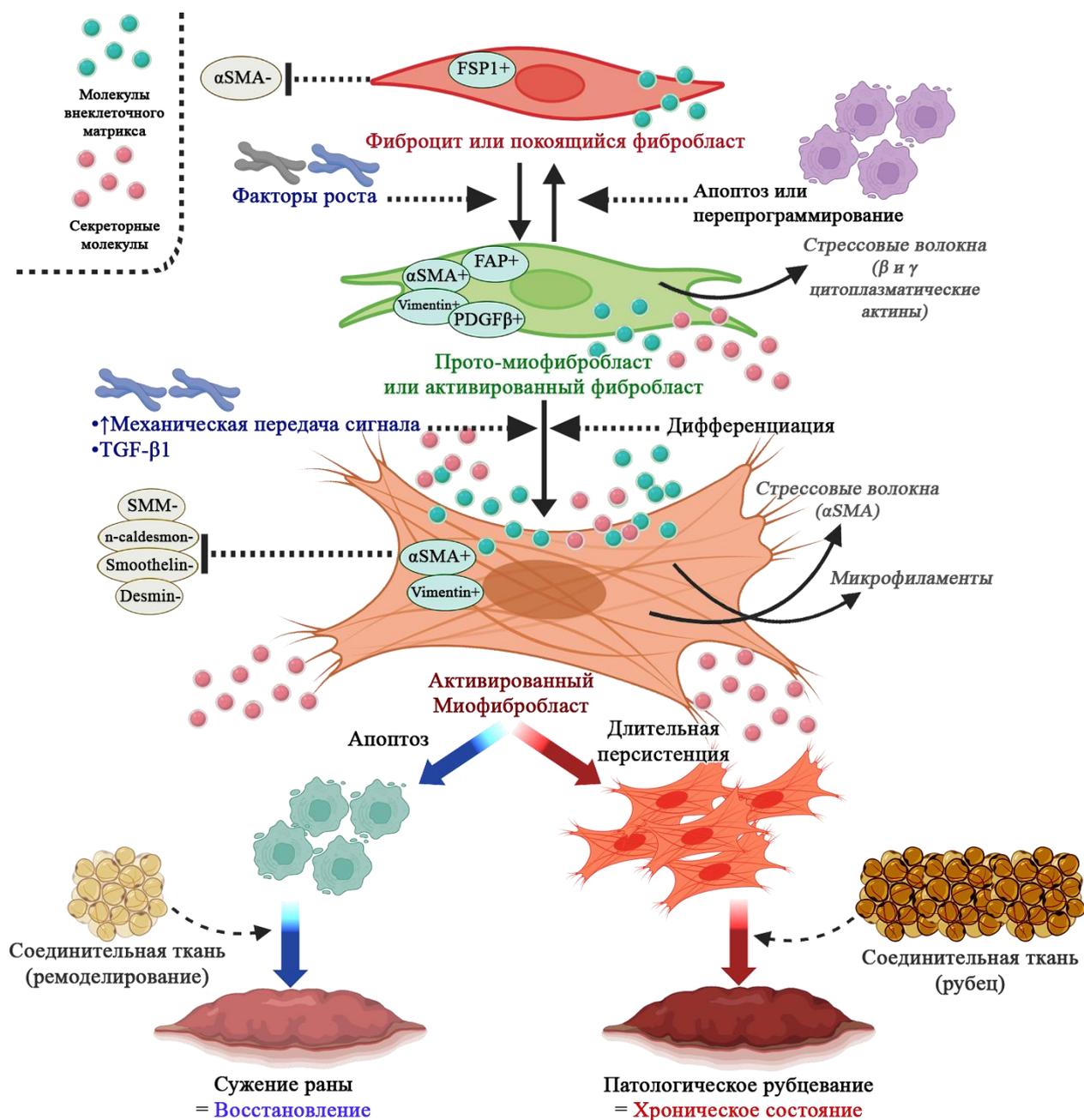


Рисунок 1. Хронология дифференцировки фибробластов и их роль в заживлении повреждений кожи.

Каскад заживления ран обычно протекает в 3 взаимосвязанных и перекрывающихся фазах – фазе воспаления, фазе пролиферации и фазе ремоделирования. Механизмы, лежащие в основе этих фаз, включают: (1) медиаторы воспаления и факторы роста; (2) взаимодействия клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс, которые управляют пролиферацией, миграцией и дифференцировкой клеток; (3) события, связанные с эпителизацией, фиброплазией и ангиогенезом; (4) сужение раны; и

(5) ремоделирование. Каждая фаза протекает в течение разных периодов времени и начинается в момент физической травмы (ранение) и продолжается непрерывно на протяжении всего процесса восстановления (формирование рубца) [52]. Процесс заживления ран включает в себя активность множества типов клеток: тромбоциты, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, фибробласты, кератиноциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки и миофибробласты. Фибробласты, в частности, уже долгое время считаются основными участниками этого процесса, так как они выполняют критически важные функции на протяжении всех трех этапов заживления (рис. 1). Они находятся в неповрежденной ткани, где они поддерживают ЕСМ. Появление фибробластов вблизи места повреждения начинается через 3-5 дней после травмы и может длиться до 14 дней. Фибробласты инфильтрируют и разрушают фибриновый сгусток, продуцируя различные матриксные металлопротеиназы (ММП). Кроме того, что наиболее важно, гликозаминогликан, гиалуроновая кислота и фибронектин служат каналом для направления фибробластов во временную матрицу фибринового сгустка [73]. Растворимый фибронектин в плазме улучшает свертываемость крови, заживление ран и фагоцитоз. Позже он заменяется компонентами ЕСМ, такими как гликопротеины, гликозаминогликаны, коллаген I-IV, XVIII, ламинин, протеогликаны, тромбоспондин, гиалуроновая кислота и гепарансульфат [74]. Фибробласты привлекаются к месту раны главным образом с помощью хемоаттрактантов, таких как $TNF\alpha$, PDGF и $IL-1\beta$. Эти хемокины играют решающую роль в направлении фибробластов к месту раны, и они делают это путём связывания со специфическими рецепторами на поверхности клетки [75]. Они либо вырабатываются, либо высвобождаются тромбоцитами и макрофагами как часть воспалительной ответной реакции [76]. Во время фазы пролиферации основными вовлечёнными клетками являются фибробласты; поскольку они активно размножаются с целью закрытия раны. Наконец, ремоделирование раны включает накопление грануляционной ткани, а фибробласты являются

критическими компонентами грануляционной ткани. В заживающей ране увеличивается количество фибробластов, в то время как количество воспалительных клеток уменьшается. После этой фазы происходит сужение раны, которое контролируется миофибробластами [77].

Лучевая терапия (ЛТ) часто используется в схемах лечебного и паллиативного лечения различных злокачественных новообразований. Несмотря на достижения в технологиях лучевой терапии, большинство пациентов по-прежнему страдают от ее побочных эффектов. Более чем у 95% пациентов, проходящих лучевую терапию, может развиваться та или иная форма радиационного дерматита или радиационно-индуцированного повреждения кожи, которые обычно разделяют на острые и хронические [78]. Это влияет на качество жизни пациента во время и после лечения. В тяжелых случаях приходится ограничивать дозу или прерывать план лечения, что негативно влияет на результат лечения [79]. Острый лучевой дерматит возникает в течение нескольких недель после радиационного воздействия и может привести к серьезному и обширному поражению [80]. У пациента могут наблюдаться изменения кожи, начиная от слабой эритемы (покраснение) и шелушения кожи до некроза кожи (гибель клеток кожи) и изъязвлений, в зависимости от тяжести реакции [81]. Различают 4 степени острого дерматита: I – лёгкое покраснение, сухость или шелушение кожи; II – эритема, повышенная влажность в складках и умеренная отёчность; III – сливное, влажное шелушение диаметром более 1,5 см, не ограничивающееся складками кожи, сильные отеки; IV – некроз кожи или изъязвление дермы по всей глубине [82]. Характер клинических проявлений связан с дозой облучения. Воздействие рентгеновского излучения в дозе приблизительно 2 Гр может вызвать раннюю переходящую эритему, которая обычно проявляется в течение первых нескольких часов. При увеличении дозы до 6-10 Гр, через 7-10 дней можно заметить слабую эритему и выпадение волос [80]. При ещё больших дозах, 12-20 Гр, спустя две-три

недели развиваются более интенсивные симптомы, такие как выраженная эритема и усиление пигментации кожи [80, 83]. При дозах более 20 Гр существует высокая вероятность сухого или влажного шелушения и изъязвлений [83]. Тяжелое радиационное воздействие может привести к потере обнаженного эпидермиса с постоянным отеком и экссудацией фибрина. Если инфекция не развивается, процесс восстановления кожи, или реэпителизация, начинается примерно через 10-14 дней после облучения [83]. Спустя год после радиационного воздействия, кожа становится более тонкой, а количество кровеносных сосудов сокращается, что повышает её уязвимость к инфекциям и повреждениям [84]. Несмотря на то, что кожа может сохранять внешне нормальный вид в течение нескольких месяцев или даже лет после радиотерапии, в дальнейшем может развиваться хронический радиационный дерматит. Хроническое радиационное воздействие может начаться с отсроченного изъязвления, некроза дермы, фиброза или телеангиэктазии [84]. Хроническое радиационно-индуцированное повреждение кожи является постоянной, прогрессирующей и часто необратимой формой дерматита, которая серьезно влияет на качество жизни пациента [85]. Таким образом, лечение радиационно-индуцированных повреждений кожи во время и после лечения является важным аспектом лучевой терапии.

Воспалительная реакция возникает в коже сразу после облучения, при этом нейтрофилы притягиваются к облученному участку цитокинами, выделяющимися из поврежденной кожи и эндотелиальных клеток, и высвобождаются провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин-6 (IL6) [85]. Радиационно-индуцированное повреждение, которое характеризуется кожными симптомами, приводит к высвобождению активированных факторов роста, которые влияют на клеточную пролиферацию [83]. Облучение разрушает базальные кератиноциты и нарушает способность эпидермиса к самообновлению [80]. Независимо от

времени возникновения эритемы (немедленного или отсроченного), ионизирующая радиация приводит к расширению сетчатых гребней, набуханию эндотелия, фиброзированию и утолщению стенок сосудов [80]. Кроме того, в эпидермисе также развивается атрофия и придаточные структуры [84]. Также наблюдаются экстравазация эритроцитов и внутрисосудистые тромбозы [84]. Дегенерация базальных кератиноцитов приводит к выпадению волос, а дермальные коллагеновые волокна имеют тенденцию увеличиваться в количестве и становиться грубыми [84]. Каждое дополнительное воздействие ЛТ приводит к дальнейшему прямому повреждению тканей, воспалению и нарушению регенерации, и всё это способствует развитию локального лучевого поражения [86].

Развитие радиационно-индуцированного фиброза также опосредовано воспалением, которое начинается сразу после лучевой терапии и продолжается от месяца до нескольких лет [3]. TNF- α , IL-6 и IL-1 участвуют в воспалительной реакции, тогда как TGF- β и фактор роста тромбоцитов регулируют активность фибробластов и способствуют выработке белков внеклеточного матрикса [87]. Фибробласты являются ключевыми клетками в развитии поздних радиационно-индуцированных фиброзных изменений [88]. Постоянно атипичные фибробласты могут вызывать атрофию, сокращение и фиброз кожи [89]. TGF- β представляет собой регуляторный белок, который контролирует заживление ран, пролиферацию и дифференцировку нескольких типов клеток, а также синтез белков внеклеточного матрикса при воспалительной реакции нормальной ткани [90]. Его основная функция в соединительных тканях *in vivo* – стимулировать рост. Пролиферация эндотелиальных клеток также стимулируется, но рост эпителиальных клеток ингибируется [90].

1.2. Клеточный отклик на образование двунитевых разрывов ДНК

В отличие от других видов повреждений ДНК, например, модифицированных оснований или однонитевых разрывов ДНК, ДР ДНК

образуются редко [91]. Они могут возникать под влиянием как внешних ДНК повреждающих агентов, таких как ионизирующее излучение, так и в результате эндогенных процессов, к примеру, во время репликации ДНК, когда может происходить коллапс репликационной вилки [92, 93]. ДР могут быть полезными или вредными в зависимости от контекста. С одной стороны, запрограммированные эндогенные ДР необходимы для стимулирования разнообразия генома при мейозе и V(D)J рекомбинации, соответственно [94]. Однако ДР, индуцированные ДНК повреждающими агентами, чрезвычайно опасны и приводят к различным цитогенетическим нарушениям, старению, клеточной гибели или онкогенезу [94-96]. Чтобы предотвратить эти негативные последствия, в клетках активируется комплекс биохимических, молекулярных и клеточных реакций, объединяемых общим термином – клеточный отклик на повреждение ДНК (англ. DNA Damage Response – DDR). Упрощенная схема клеточного отклика на повреждение ДНК представлена на рис. 2. Основные вопросы исследования связаны с механизмами, посредством которых клетка обнаруживает и узнаёт сигналы о повреждениях ДНК, а также с тем, каким образом начинается серия биохимических реакций, передающих этот сигнал. В этом контексте, сенсоры повреждения ДНК и трансдукторы (преобразователи) ранних сигналов выполняют ключевую функцию, обеспечивая распознавание повреждений ДНК [97, 98]. Идеальные сенсоры повреждения ДНК – это белки, которые первыми взаимодействуют с повреждёнными участками ДНК, идентифицируют сигналы повреждения и инициируют процесс клеточной сигнальной трансдукции [99-101]. Более того, сенсоры повреждения ДНК также обладают способностью привлекать белки DDR к участкам повреждения ДНК [102, 103]. На первом этапе, концы ДНК распознаются и связываются MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) комплексом, образование которого является ключевым для запуска процесса репарации ДНК. Многие исследователи к важнейшим сенсорным белкам относят и γ H2AX [104]. Белок γ H2AX играет роль не только в ремоделировании структуры

хроматина, но и в амплификации сигнала DDR. Это достигается за счёт взаимодействия с белком MDC1 (англ. mediator of damage-checkpoint 1), что приводит к активации киназы ATM. Активированная киназа ATM, в свою очередь, фосфорилирует H2AX, что увеличивает количество белка γ H2AX [12].

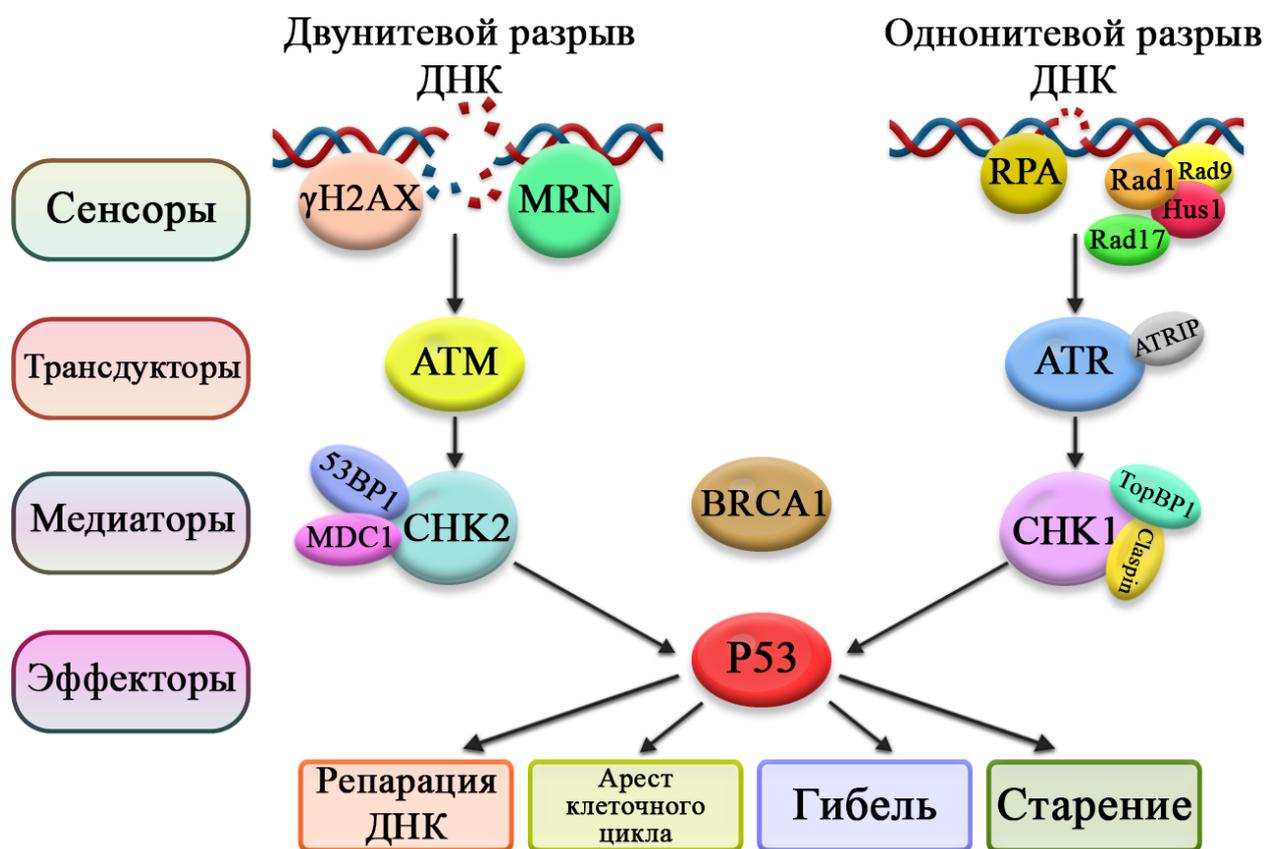


Рисунок 2. Упрощенная схема клеточного отклика на повреждение ДНК (DNA Damage Response - DDR). Адаптировано из Мирза-Агазаде-Аттари и др. [104].

Белки-трансдукторы часто выступают в качестве функциональных партнеров сенсоров DDR, что затрудняет их однозначную классификацию [103, 105]. Эти трансдукторы обладают киназной активностью, что позволяет им передавать химические сигналы о повреждениях ДНК, инициируя тем самым реакции биохимической модификации и активизируя белки DDR

[106]. В качестве основных трансдукторов сигнала выступают представители семейства фосфатидилинозитол-3-киназ-подобных киназ (PIKK), включая ATM (англ. ataxia-telangiectasia mutated, мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок), DNA-PK (англ. DNA-dependent protein kinase, ДНК-зависимая протеинкиназа) и ATR (англ. ataxia telangiectasia and Rad3-related protein, атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок) [107]. Эти киназы сигнализируют нижестоящим контрольным точкам клеточного цикла и локализуют восстановление структуры ДНК в местах повреждения [107].

Белки-медиаторы, включая MDC1 (медиатор контрольной точки повреждения ДНК), 53BP1 (p53-связывающий белок 1) и BRCA1 (белок восприимчивости к раку молочной железы 1 типа) для ATM, а также TopBP1 (белок, связывающий топоизомеразу 1) и Claspin для ATR, инициируют активацию киназ Chk1 и Chk2 [108]. Эти киназы затем распространяют сигнал по ядру клетки. В свою очередь, эффекторные белки p53 и Cdc25 регулируют клеточный цикл посредством циклин-зависимых киназ, которые контролируют переход из G1 в S фазу (G1/S checkpoint), репликацию ДНК (checkpoint внутри фазы S) и переход из фазы G2 в митоз (G2/M checkpoint) [109]. p53, известный также как «страж» генома, также обеспечивает контроль гибели клеток, старении, воспалении и онкотрансформации [110].

Таким образом, стимул (повреждение ДНК) обнаруживается сенсором, который запускает активацию системы трансдукции, состоящей из вышестоящих (проксимальных) и нижестоящих (дистальных) протеинкиназ вместе с рядом адаптерных белков [111]. Этот киназный каскад усиливает первоначальный сигнал о повреждении ДНК и запускает разнообразный набор выходных сигналов, воздействуя на широкий спектр эффекторных белков [111]. Необходимо при этом понимать, что деление белков DDR на функциональные классы является условным, так как эти белки часто являются мультифункциональными. Главным вопросом является понимание

ранней последовательности событий в DDR, которые происходят между образованием повреждений ДНК и активацией процесса репарации.

После возникновения ДР ДНК, её структура может быть восстановлена двумя основными путями: негомологичным соединением концов (NHEJ) [112] и гомологичной рекомбинацией (HR) (рис. 3) [113].

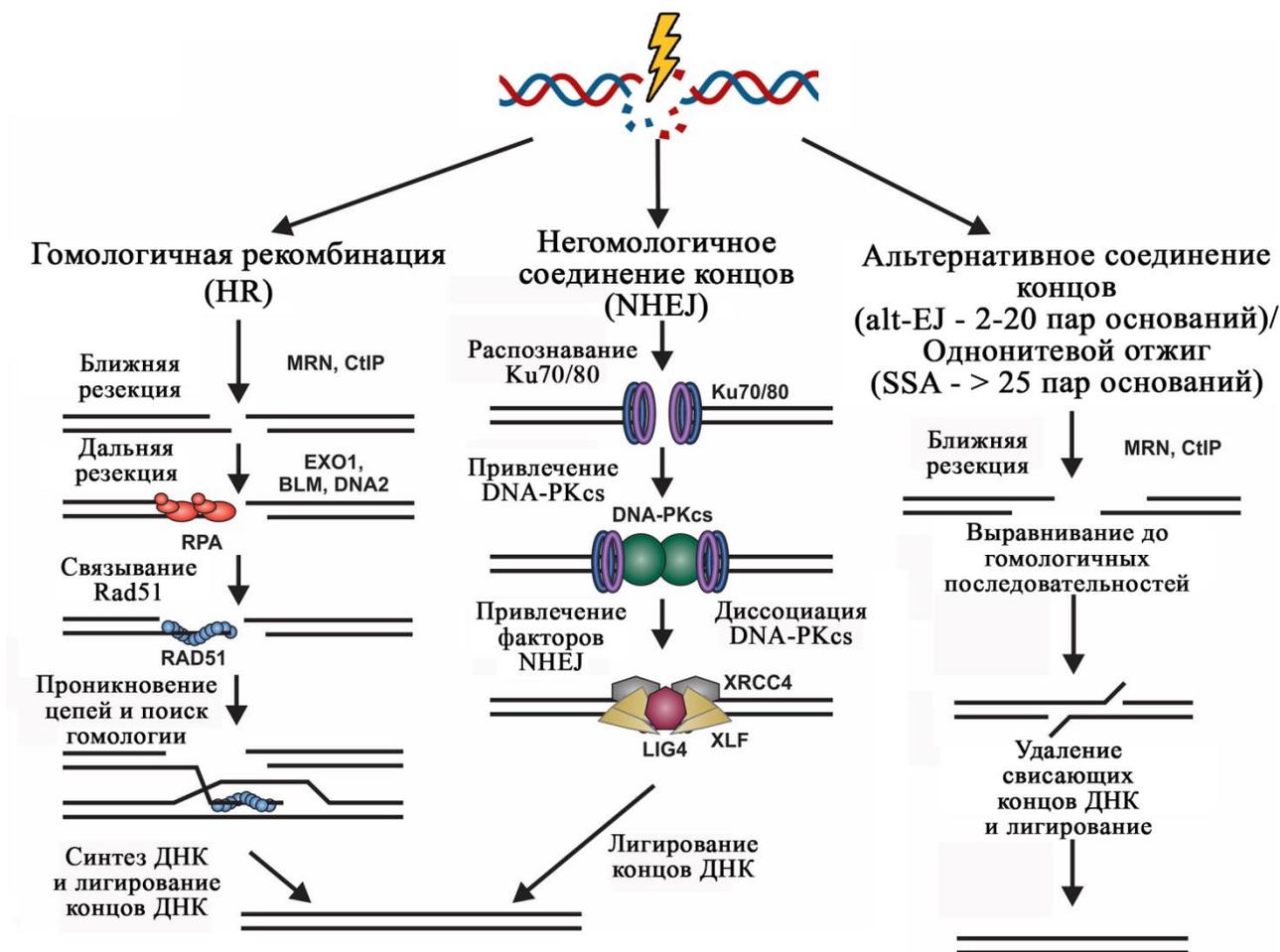


Рисунок 3. Упрощенная схема путей репарации двунитевых разрывов ДНК. Адаптировано из Акерсон и др. [94].

В процессе NHEJ, гетеродимер Ку, который состоит из двух субъединиц – Ку70 и Ку80 (или Ку86), присоединяется к концам повреждённой ДНК. Это событие запускает цепную реакцию, привлекая и

активируя ДНК-зависимую протеинкиназу (ДНК-РКс). Активированная ДНК-РКс, в свою очередь, стимулирует работу ферментов, необходимых для окончательной обработки концов ДНК, включая полимеразы и ДНК-лигазу IV. [114]. Также существует альтернативные механизмы. Например, Ku-независимый путь NHEJ, называемый микрогомولوجически опосредованным соединением концов (англ. Microhomology-mediated end joining – MMEJ), относящийся к механизмам альтернативного соединения концов (англ. Alternative end-joining – A-EJ). Этот путь всегда приводит к делециям последовательностей ДНК [115]. Несмотря на то, что механизмы NHEJ и MMEJ склонны к ошибкам, они функционируют во всех фазах клеточного цикла. В отличие от них, HR преимущественно происходит в S и G2 клеточного цикла, так как HR использует сестринские хроматиды для точной репарации ДНК. Хотя существует несколько путей HR [113], она всегда инициируется генерацией ssDNA (одноцепочечной ДНК), которая стимулируется различными белками, включая комплекс MRE11-RAD50-NBS1 (MRN). В ходе событий, катализируемых RAD51 и RCA1, и BRCA2, ssDNA затем проникает в неповрежденную матрицу и, следуя действиям полимераз, нуклеаз, геликаз и других компонентов, после чего происходит лигирование ДНК и растворение субстрата. HR также используется для перезапуска остановленных репликационных вилок и восстановления межцепочечных сшивок ДНК, в восстановлении которых также участвует белковый комплекс при анемии Фанкони (FA) [116]. Альтернативным механизмом репарации ДНК является также одонитевой отжиг (англ. single-strand annealing – SSA). SSA использует гомологичные повторы по обе стороны от ДР для соединения концов ДНК [117]. Этот процесс склонен к ошибкам, так как в процессе соединения удаляются фрагменты ДНК, расположенные между гомологичными участками. Наблюдаемые в опухолевых клетках делеции ДНК часто содержат гомологичные участки, что свидетельствует об участии SSA [117]. В случаях, когда множественные ДР происходят в различных хромосомах, SSA может

привести к хромосомным транслокациям, которые играют значительную роль в развитии различных видов злокачественных новообразований [117]. Несмотря на определённое сходство механизмов, SSA не является вариантом HR или NHEJ, так как его действие определяется различными белками и биохимическими реакциями [118]. Исследования Аль-Минави и др. показали, что ингибирование ключевых белков DDR, таких как ATM, DNA-ПК, CHK1 и CDK2, не оказывает влияния на SSA [119].

В клетках млекопитающих, ключевую роль в DDR играют протеинкиназы ATM и ATR. Они активируются в ответ на ДР ДНК и ssDNA [120, 121]. Протеинкиназы CHK1 и CHK2 являются основными целями ATM и ATR и участвуют в снижении активности циклин-зависимых киназ (CDK), что достигается через различные пути, в том числе через активацию транскрипционного фактора p53 [121-123]. Ингибирование CDK замедляет или останавливает клеточный цикл на контрольных точках G1-S, intra-S и G2-M, что предположительно даёт больше времени для репарации ДНК перед началом репликации или митоза. В то же время, сигнальные пути ATM и ATR усиливают процессы репарации ДНК, стимулируя экспрессию и активность репарационных белков, привлекая их к местам повреждения и модифицируя их посредством фосфорилирования, ацетилирования, убиквитинирования или сумоилирования [124]. Исследования протеомики выявили множество неописанных до сих пор сайтов фосфорилирования, что указывает на возможное влияние DDR на дополнительные клеточные процессы [125]. Если репарация ДНК проходит успешно, происходит инактивация DDR, что позволяет клетке возвращаться к нормальному функционированию. В случае неудачи, DDR инициирует клеточную гибель через апоптоз или аутофагию, либо вызывает клеточное старение, что служит защитой от образования злокачественных опухолей [126, 127]. Структура хроматина также влияет на DDR [121, 128], изменяясь в ответ на повреждение ДНК, как это видно на примере фосфорилирования H2AX,

приводящего к образованию γ H2AX на участках хроматина, фланкирующих ДР ДНК [121, 128]. Также сообщалось о фосфорилировании в ходе DDR H2AX по тирозину-142 [129, 130]. Образование γ H2AX приводит к релаксации хроматина в сайтах ДР ДНК, образованию убиквитин-аддукта в таких областях и привлечению факторов DDR и других компонентов, модифицирующих хроматин, которые, как полагают, вместе способствуют репарации ДР ДНК и усиливают передачу сигналов ДР ДНК [124].

1.3. Фокусы белков репарации ДНК в радиобиологических исследованиях

В середине 90-х годов несколько групп исследователей идентифицировали зависящие от повреждения ДНК фокальные скопления в ядрах как факторы репарации ДНК [131]. Одно из самых ранних описаний фокусов белка репарации ДНК было в исследовании Rad51 млекопитающих Уордом и его коллегами в 1995 году [132]. Эти фокусы Rad51 образовывались в ответ на ДР ДНК, индуцированные ионизирующим излучением, или в ответ на алкилирующие ДНК-агенты, такие как метилметансульфонат. Вскоре после этого, в 1997 году, Петрини и его коллеги ввели понятие «фокусы, индуцированные ионизирующим излучением» (англ. ionizing radiation induced foci – IRIF), чтобы охарактеризовать сходные скопления фокусов Mre11 и Rad50 – двух компонентов комплекса Mre11/Rad50/NBS1 (MRN) [133]. Этот комплекс играет ключевую роль в первоначальном процессинге ДР ДНК [134]. На данный момент эти скопления белков чаще всего называют «фокусами репарации ДНК», «фокусами белков репарации ДНК» или «фокусами повреждения ДНК» [19]. По сути, все они представляют собой фокальные скопления белков DDR. Эти скопления формируются в сайтах ДР ДНК и могут быть обнаружены с помощью микроскопии после проведения иммуноцитохимического или гистохимического окрашивания, либо благодаря прямому флуоресцентному мечению белков (рис. 4) [135].

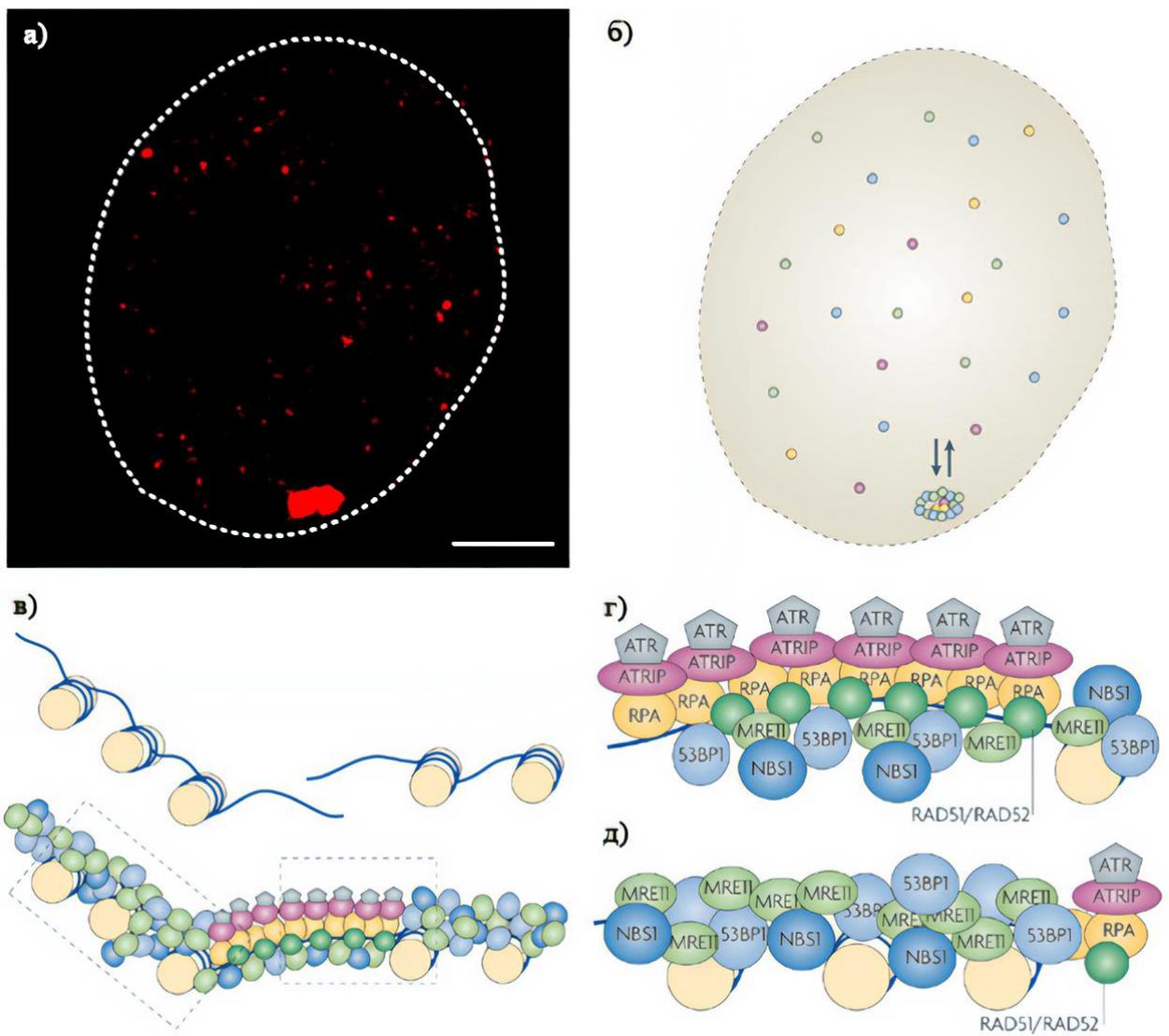


Рисунок 4. Фокусы белков репарации ДНК: а) Микрофотография фокусов белков репарации ДНК (красные) в ядре клетки; б) Виды факторов репарации ДНК, обозначенные разными цветами; в) Схематическая иллюстрация «микроструктуры» фокусов белков репарации ДНК; г) Гипотетическая организация микрокомпонента одной из нитей ДНК; д) Гипотетическая организация области, расположенной рядом с ДР ДНК. Адаптировано из Мистели и Сутоглу [128].

Уорд предположил, что эти скопления представляют собой «домены репарации», где структура ДНК восстанавливалась или где факторы

репарации, такие как Rad51, локализовались в клетках, которые подверглись повреждению ДНК [132]. Аналогично, Петрини предположил, что IRIF могут представлять собой участки рекомбинации ДНК, и отметил, что их индукция была максимальной через несколько часов после того, как большинство разрывов ДНК были восстановлены, что ставит под сомнение их функцию в поздние моменты времени после повреждения ДНК [133]. Однако дальнейшие исследования функции фокусов в репарации ДНК должны были бы подождать открытия нового белка-маркера для ДР ДНК. Этот маркер ДР ДНК был охарактеризован в 1999 году Боннером и его коллегами. Он представляет собой скопления фосфорилированного гистона H2AX, известного как γ H2AX, в клетках, подвергшихся воздействию ИИ, либо вдоль пути лазерно-индуцированных разрывов ДНК [136]. Количество фокусов γ H2AX коррелировало с дозой излучения и совпадало с кинетикой репарации ДНК. Затем было обнаружено, что киназы семейства фосфоинозитид-3-киназ ATM, ATR и DNA-PKcs были ответственны за фосфорилирование H2AX [135, 137-139]. Обнаружение фокусов γ H2AX также привело к валидации 53BP1, MDC1 и комплекса MRN как ранних участников отклика на разрывы ДНК [140-144]. Концепция фокусов белков репарации ДНК оказалась весьма значимой, так как исследование этих структур дало возможность непосредственно визуализировать процессы репарации на молекулярном уровне в местах повреждения ДНК. За последние десять лет анализ фокусов белков репарации стал ключевым методом в изучении механизмов репарации ДНК. Эти фокусы служат молекулярными маркерами для исследования сигнальных путей, активируемых в ответ на повреждение ДНК, и способствуют обнаружению новых компонентов, участвующих в процессе репарации. Также фокусы позволяют получить информацию о локальных изменениях структуры хроматина и эпигенетических модификациях, которые происходят в областях возникновения разрывов ДНК [145]. Помимо хроматина, повреждения ДНК также влияют на динамическое поведение, морфологию и биохимический состав различных субъядерных доменов,

включая ядрышко, ядерные тельца промиелоцитарного лейкоза и тельца Кахаля [131, 145, 146]. Эти изменения в ядрах клетки тесно связаны с клеточным ответом на повреждения ДНК [146].

Фокусы белков репарации ДНК активно исследуются в экспериментах на всех известных клеточных линиях, первичных клеточных культурах, лимфоцитах периферической крови, трехмерных моделях тканей *in vitro*, а также в экспериментах *in vivo* [147]. Использование флуоресцентно-меченных белков позволяет отслеживать образование и элиминацию фокусов в живых клетках [148]. Методы иммуногистохимического окрашивания также успешно применяются для выявления фокусов на срезах, полученных из зафиксированных формалином и залитых парафином тканевых блоков [149]. Количественная оценка фокусов может быть выполнена путём ручной или автоматической оценки с использованием различных пакетов программного обеспечения для анализа изображений [150-154]. Во всех случаях крайне важно определить и поддерживать строгие критерии оценки. Поскольку оценка сильно зависит от качества окрашивания и характеристик изображения, хорошей практикой является включение позитивных и негативных контрольных образцов, которые помогают подтвердить достоверность и воспроизводимость результатов, полученных в конкретном эксперименте. Подходы, основанные на интенсивности флюоресценции, такие как проточная цитометрия, также широко используются для изучения белков, образующих фокусы [155, 156]. Однако следует подчеркнуть, что эти методы анализа, которые просто измеряют общее содержание белка или его модификацию, обычно менее чувствительны, чем методы визуализации и не обращают внимания на внутриядерное пространственное распределение скоплений интересующих белков [157]. Фокусы белков ДНК в настоящее время помимо радиобиологии широко используется в ряде смежных областей, таких как токсикология, физиология, геронтология, онкология и т.д. [19].

1.4. Радиационно-индуцированная клеточная гибель и клеточное старение

Исторически в радиобиологии сложилось так, что радиационно-индуцированная гибель клеток разделяется всего на два типа: интерфазная (ранняя) и репродуктивная (поздняя) [158]. Интерфазный тип гибели клеток происходит в течение нескольких часов после облучения и характерен для клеток с ограниченной способностью к делению. Репродуктивная гибель клеток наступает после одного или нескольких циклов деления. При этом клетки, которые перестают делиться, также считаются репродуктивно погибшими [158]. Репродуктивная гибель характерна для быстроделющихся и малодифференцированных клеток. Основная причина – нерепарируемые или некорректно отрепарированные повреждения ДНК, прежде всего ДР [159, 160]. Возникшие нарушения приводят к митотической катастрофе, сенесценции (потере способности к делению) или гибели потомков клеток. Некоторые типы аберраций, возникшие в результате некорректной репарации ДР ДНК, механически препятствуют делению клетки, другие ведут к неравномерному разделению хромосомы, утрате генетического материала и гибели клетки из-за нехватки метаболитов, чей синтез кодировался утраченным фрагментом [159, 160].

Важно не путать типы и молекулярные механизмы радиационно-индуцированной гибели. На рис. 5 представлена упрощенная схема демонстрирующая основные молекулярные механизмы клеточной гибели и сенесценцию (клеточное старение), которая вносит важный вклад в репродуктивную гибель, и на этом основании многие исследователи относят её также к молекулярным механизмам клеточной гибели [161]. В соответствии с рекомендациями Комитета по номенклатуре клеточной смерти, на данный момент выделяют примерно 20 различных молекулярных механизмов, ответственных за клеточную гибель [159]. В данном обзоре будут рассмотрены лишь те механизмы клеточной гибели, которые имеют значение для понимания проводимого исследования.

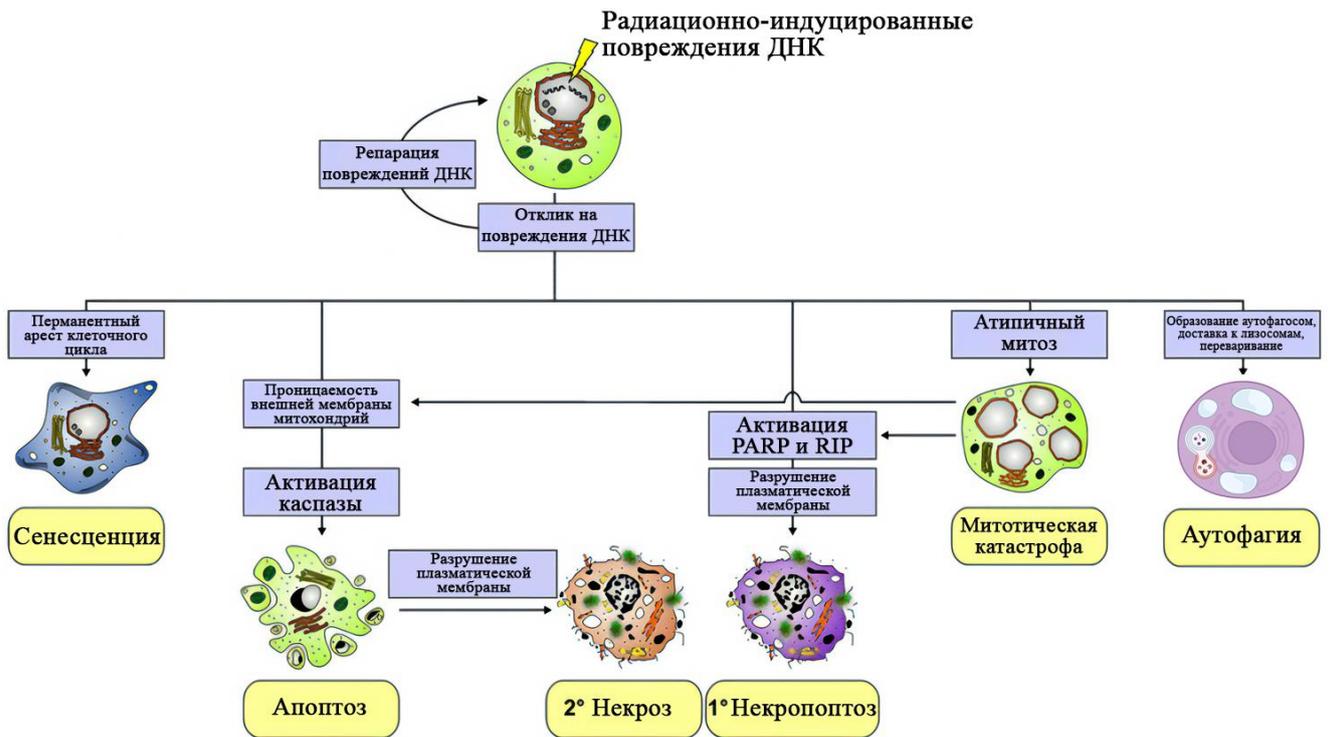


Рисунок 5. Основные механизмы радиационно-индуцированной и клеточной гибели и сенесценция. Адаптировано из Лаубер и др. [161].

Апоптоз

Термин «апоптоз» (от др.-греч. ἀπόπτωσις – «опадание») был впервые введен Керром, Уайли и Карри в 1972 году [162]. Апоптоз – это генетически-регулируемый, энергозависимый, активный и запрограммированный процесс гибели клеток, сопровождающийся внутриядерной конденсацией хроматина с последующей межнуклеосомной фрагментацией ДНК (лесенка при электрофорезе), пикнозом и образованием апоптотических телец, которые в конечном счете поглощаются окружающими клетками (преимущественно макрофагами) [163, 164]. Метаболическая активность и целостность плазматической мембраны поддерживаются в определенной степени, не провоцируя воспаления. Инициация апоптоза в основном осуществляется двумя различными путями, внутренним и внешним, оба из которых в конечном счете завершают апоптоз [164, 165].

Внутренний апоптоз инициируется нарушениями внутриклеточных структур, включая повреждение ДНК, стресс эндоплазматического

ретикулума (англ. endoplasmic reticulum – ER), дисфункцию митохондрий, изменения микротрубочек и митотические дефекты [165]. Этот тип апоптоза характеризуются повышенной проницаемостью внешней мембраны митохондрий и, в конечном счете, осуществляется каспазами (главным образом эффекторной каспазой-3) [165]. В ответ на апоптотические стимулы активируются внутриклеточные проапоптотические члены семейства Bcl-2 (особенно те, которые расположены на мембране митохондрий и ER), из которых Bax (BCL2-подобный белок 4) и Bak (BCL2-гомологичный антагонист/киллер) играют ключевую роль и образуют Bax и Bak поры (активированные Bax и Bak образуют димер, который изменяет проницаемость митохондрий) непосредственно на мембране митохондрий, таким образом, это приводит к необратимой и широко распространенной пермеабилзации внешней мембраны митохондрий (англ. Mitochondrial outer membrane permeabilization – MOMP) и высвобождению митохондриальных проапоптотических факторов, включая цитохром С (CYCs), SMAC/DIABLO (второй митохондриальный активатор каспаз) и т.д. [166]. Высвобожденные CYCs, Araf 1 и предшественник каспазы-9 впоследствии образуют «апоптосому», которая, в свою очередь, активирует каспазу-9 и инициирует конечный путь реализации апоптоза [164].

Внешний апоптоз инициируется нарушениями внеклеточного микроокружения. Активация внешнего апоптоза происходит через два основных типа рецепторов плазматической мембраны: (1) рецепторы смерти, которые активируются при связывании со специфическими лигандами, и (2) рецепторы зависимости, активация которых происходит при снижении уровня определённого лиганда ниже критического порога [167]. Сигнальные системы, такие как TNFR1-TNF α , FAS (CD95, APO1-FasL), TRAILR1 (DR4)-TRAIL и TRAILR2 (DR5)-TRAIL, являются хорошо изученными примерами систем рецепторов смерти (лигандов смерти) [168]. Связывание лиганда смерти с соответствующим рецептором приводит к формированию

сигнального комплекса, индуцирующего смерть (англ. death-inducing signaling complex – DISC), который активирует прокаспазу 8 [168]. Это запускает каскад активации эффекторных каспаз-3, -6 и -7, что ведет к гибели клеток [168].

Некроз

Механизмы клеточного некроза в основном включают цитокины, ионные каналы, окислительно-восстановительные реакции, митохондрии, семейство Bcl 2, белки теплового шока, различные протеазы и нуклеазы [169]. Повышенная проницаемость мембраны некротизированных клеток провоцирует набухание клеток, деформацию органелл и, в конечном счете, разрыв, который высвобождает противовоспалительное содержимое. Уровень АТФ в некротизированных клетках настолько снижен, что физиологическая активность клеток не может поддерживаться; хроматин случайным образом распадается на фрагменты ДНК различных размеров (размытая полоса – «шмер» при электрофорезе) [169].

Аутофагия

Длительное время сам термин «запрограммированная клеточная гибель» ассоциировался с наиболее подробно описанной и изученной формой – апоптозом. Однако в настоящее время появляется всё больше данных о другом механизме программированной клеточной гибели – аутофагии (от др.-греч. αὐτός – сам и φαγεῖν – «есть, пожирать»). Более того, современные исследования показывают, что доля облучённых клеток, гибнущих по механизму апоптоза, составляет всего около 20% [170]. В то время как апоптоз является программой клеточной гибели, аутофагия представляет собой программу выживания клетки в неблагоприятных условиях, в частности, под воздействием ИИ. В процессе аутофагии клетка переваривает часть своих органелл и белков, таким образом, резко снижая энергопотребление и высвобождая аминокислоты, жирные кислоты и другие

вещества для своих текущих нужд [170]. В результате клетка частично «поедает» сама себя, но остаётся жива. При прекращении воздействия неблагоприятных условий она может восстановиться. При этом аутофагия может привести и к полному самопоеданию клетки, переваривая все органеллы клетки и оставляя клеточный дебрис для фагоцитоза макрофагами [170].

Существует три типа механизмов аутофагии: аутофагия, опосредованная работой шаперонов, микроаутофагия и макроаутофагия [171]. Аутофагия, опосредованная работой шаперонов, характеризуется специфической доставкой некоторых цитоплазматических белков в лизосомы с помощью шаперона Hsc70 [171]. Микроаутофагия представляет собой процесс поглощения и переваривания небольших участков цитоплазмы лизосомами [172]. Процесс макроаутофагии схематично представлен на рис. 6. В процессе макроаутофагии участок цитоплазмы окружается мембраной, образуя аутофагосому, которая затем сливается с первичными лизосомами, образуя аутофаголизосомы, где перевариваются органеллы и остальное содержимое аутофагосом [172]. Макроаутофагия является наиболее значимой среди этих процессов, поэтому далее под аутофагией мы будем подразумевать именно макроаутофагию.

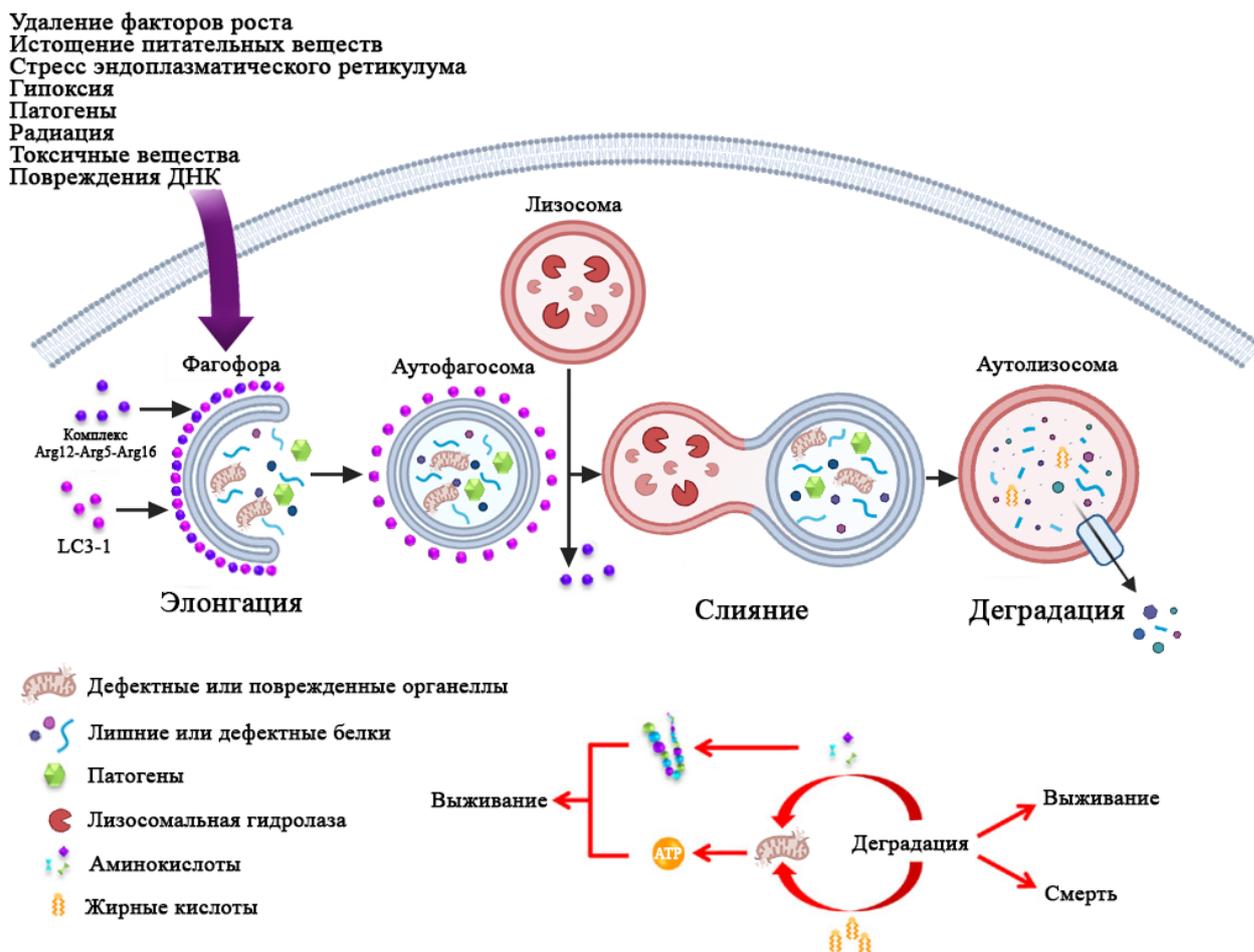


Рисунок 6. Схема аутофагии (макроаутофагии). Адаптировано из Родригес-Роча и др. [170].

В клетках млекопитающих инициация классического пути аутофагии в основном осуществляется взаимодействием мишени млекопитающих комплекса рапамицина 1 (mTORC1) и комплекса ULK 1 (Atg 1) [173]. При обнаружении раздражителей, таких как дефицит питательных веществ, гипоксия или клеточный стресс, АМФ-активируемая протеинкиназа (англ. AMP-activated protein kinase – AMPK) ингибирует активность комплекса mTORC1, снимая подавление аутофагии [174]. Затем mTORC1 активирует ULK1 посредством дефосфорилирования и облегчает образование комплекса ULK1 с FIP200 и mAtg13, способствуя возникновению аутофагосом. Ключевой молекулой, инициирующей образование мембраны везикул аутофагосом, является комплекс ClassIIIPI3K

(фосфатидилинозитол-3-киназа III класса/PtdIns3K) [174]. Система соединений, которая в основном основана на убиквитинировании (E1 и E2) обеспечивает связывание с Atg12 и модификацию Atg8/LC3 опосредуя расширение везикул [175]. После того, как аутофагосомы сформируются и инкапсулируют поврежденные/аномальные биологические макромолекулы или другие клеточные компоненты, они с лизосомами для их переваривания и деградации [175, 176].

В процессе аутофагии можно выделить следующие ключевые моменты: индукция аутофагии, во время которой с участием белка LC3 происходит образование фагофоры [175, 176]. Белок LC3 (микротубулин-связанный белок легкой цепи 3), присутствующий в цитозоле во многих типах клеток (в формах А, В и С), претерпевает протеолитическое расщепление цистеиновой протеазой Atg4 до формы LC3-I в начале аутофагии [177]. Далее LC3-I активируется E1-подобным ферментом Atg7 и передается к белку Atg3, что приводит к его конъюгации с фосфатидилэтаноламином и формированию LC3-II [177]. Эта модифицированная форма LC3-II интегрируется в развивающуюся фагофору и локализуется на обеих мембранах аутофагосомы. Изменение массы белка с 18 кДа (LC3-I) до 16 кДа (LC3-II) служит индикатором процесса аутофагии [177].

Ядерная аутофагия (вызванная повреждением ДНК, особенно ДР ДНК) играет ключевую роль в радиационно-индуцированной аутофагии [169]. После повреждения ДНК p53 индуцирует аутофагию посредством транскрипционной индукции нескольких генов, включая модулятор аутофагии, регулируемый повреждением (DRAM), ULK1/2, sestrin1/2 и bnip3c. АМПК-зависимое фосфорилирование ULK1 также стимулирует аутофагию [178]. Помимо повреждения ДНК, ошибки сворачивания белков, дисфункция митохондрий и стресс ER, вызванный ионизирующим излучением, также могут провоцировать аутофагию [178].

Митохондриальная аутофагия – это атипичная клеточная аутофагия, путь которой зависит от взаимодействия PINK1 (митохондриально-специфической киназы), PARKIN и убиквитинлигазы E3 [179]. Исследования показали связь между радиационно-индуцированной дисфункцией митохондрий их биогенезом и митофагией. Более того, митофагия имеет сильную корреляцию с метаболическим перепрограммированием опухолевых клеток после облучения [179]. Многие гены, регулирующие гликолиз, и специфические маркеры митофагии активируются в облучённых клетках, что обеспечивает клеткам преимущество в выживании [179]. Это также открывает новое направление для исследования в области лучевой терапии в будущем.

Сенесценция

Сенесценция, известная также как клеточное старение, представляет собой состояние, при котором клетки, ранее способные к делению, теряют эту способность и становятся нечувствительными к стимулирующим рост сигналам. Существует два основных типа сенесценции: репликативная, связанная с укорачиванием теломер и достижением лимита Хейфлика [180], и стресс-индуцированная, которая не зависит от длины теломер [181]. Одной из характерных черт клеточной сенесценции является устойчивость к апоптозу, а также развитие специфического секреторного фенотипа, связанного со старением (англ. senescence-associated secretory phenotype – SASP) [182]. Репликативное клеточное старение – это нормальное физиологическое событие, которое играет важную роль в развитии организма и профилактике злокачественных новообразований [183]. Однако, когда клетки подвергаются воздействию различных стрессовых факторов, включая ионизирующее излучение и химические агенты, хронический окислительный стресс и воспаление запускается процесс стресс-индуцированного старения [184]. Хроническое состояние радиационно-индуцированного старения вместе с секрецией провоспалительных факторов, способствуют развитию патологии,

связанной с радиационно-индуцированным повреждением нормальных тканей и органов [185]. Стресс-индуцированное клеточное старение может быть также спровоцировано несколькими нелетальными стрессовыми сигналами, и тип повреждающего события часто используется для обозначения различных форм фенотипа старения [186, 187]. Разделение на репликативное и стресс-индуцированное старение довольно условно, так как повреждения, вызывающие стресс-индуцированное старение, также могут вызвать укорочение теломер, которое вызывает репликативное старение [188]. Стрессовые факторы могут активировать онкогены, вызывая так называемое онкоген-индуцированное старение (англ. oncogene-induced senescence – OIS) [189, 190]. Терапия-индуцированное старение (англ. therapy-induced senescence – TIS) вызывается радиационной или химиотерапией и вместе с другими формами нерепликативного старения образует группу стресс-индуцированного преждевременного старения (англ. stress-induced premature senescence – SIPS) [191, 192]. Независимо от причины, стареющие клетки демонстрируют общие механизмы активации и поддержания, связанные с путями белков ретинобластомы (англ. Retinoblastoma – RB) и p53 [193, 194]. Стареющие клетки демонстрируют общие механизмы активации и поддержания, связанные с путями белков ретинобластомы (англ. Retinoblastoma – RB) и p53, где уровни и активность p53 увеличиваются в ответ на снижение активности TBX2, фактора транскрипции, подавляющего p14ARF [193-195]. Это приводит к повышению уровня p14ARF, который блокирует убиквитинлигазу MDM2 E3, отвечающую за деградацию p53 [196]. Кроме того, старение может стимулировать экспрессию белка PML, который взаимодействует с ацетилтрансферазами CBP и p300, формируя комплекс PML-ацетилтрансфераза, который ацетирует p53, усиливая его активность [197-200]. Активированный p53 может индуцировать транскрипцию генов, влияющих на старение, включая CDK ингибитор p21 и киназу ВТК, которая

увеличивает стабильность p53 и его функции, связанные со старением [201-204].

В стареющих клетках белок RB находится в гипофосфорилированной активной форме, что приводит к остановке роста клетки [205]. Старение также уменьшает активность BMI-1, что усиливает регуляцию p16 [206]. Активация p16 приводит к ингибированию CDK, фосфорилирующих RB, поддерживая остановку клеточного цикла. [196, 205-207]. Пути p53 и pRB взаимодействуют на разных уровнях во время старения. Например, индуцированный p53, p21 может блокировать CDK, инактивирующие RB, и усиливать окислительный стресс, что усиливает остановку клеточного цикла [208-210]. RB может связывать MDM2, предотвращая деградацию p53, а инактивация этих путей может отложить или отменить старение [196, 198].

Стареющие клетки отличаются от нормальных или покоящихся клеток по ряду молекулярных маркеров и фенотипических изменений [200, 211, 212]. Это включает в себя изменения морфологии, приводящие к увеличению и уплощению клеток с выступающими ядрышками и цитоплазматическими гранулами; изменения в организации хроматина, приводящие к образованию SAHF; высокое содержание лизосом; и изменения в экспрессии генов [213]. Стареющие клетки также секретируют факторы SASP, включая цитокины, хемокины, факторы роста и протеазы, выполняющие аутокринные и паракринные функции [214]. Стареющие клетки отличаются от нормальных или покоящихся клеток по молекулярным маркерам и фенотипическим изменениям, включая изменения хроматина, усиливающие старение [215]. Для оценки старения часто используется активность β -галактозидазы, ассоциированной со старением (SA- β -Gal), так как её активность в стареющих клетках выше из-за увеличения массы лизосом [216, 217].

В таблице 1 представлены наиболее известные маркеры клеточного старения. Полужирным шрифтом выделены маркеры, используемые в настоящей работе.

Таблица 1. Общепринятые маркеры клеточного старения (адаптировано из [45]).

<u>Характеристика стареющих клеток</u>	<u>Биомаркер</u>	<u>Характер или направленность изменений маркера</u>	<u>Тип старения</u>
<i>морфологические изменения</i>	общая морфология, размеры	широкие и уплощенные клетки	общий
<i>лизосомальная активность</i>	СА-β-галактозидаза, СА-α-фукозидаза, липофусцин	увеличение	общий
<i>повреждение ДНК, DDR</i>	фокусы γH2AX, 53BP, ATM и др.	увеличение	общий/ повреждение-индуцированный
<i>снижение/отсутствует синтез ДНК</i>	BrdU, EdU	снижение	общий
<i>отсутствие пролиферации</i>	Ki-67	снижение	общий
<i>путь p16/pRB</i>	p16INK4a, pRB p-pRB	увеличение	общий
<i>путь p53/p21</i>	p53, p21, DEC1, PPP1A	увеличение	общий/ повреждение-индуцированный
<i>Повышенная продукция АФК</i>	АФК	увеличение	общий/стресс-индуцированный
<i>длина теломер</i>	теломеры	снижение	репликативный
<i>SAHF's</i>	SAHF's, HP1-gamma, H3K9-метилирование, PML bodies	увеличение	общий/ повреждение-индуцированный
<i>ядерная мембрана</i>	lamin B1	снижение	общий
<i>секреция цитокинов</i>	SASP	увеличение	повреждение- и онкоген-индуцированный

Также маркерами стареющих клеток могут служить белки, участвующие в остановке роста, связанного со старением [218]. К ним относятся гены-супрессоры опухолей (p16, p53, p21, p27Kip1), а также определенный набор белков, связанных с плазматической мембраной,

известной как стареющий поверхностный слой (белки ARMCX3, B2MG, PLD3, NTAL, LANCL1, VPS26A, DEP1, DPP4 и SCAMP4) [212, 219-221].

Анализ репродуктивной гибели

Как уже упоминалось, в случае репродуктивной гибели неважен механизм, по которому клетка или её потомки погибли или перестали делиться. Такие клетки являются репродуктивно-погибшими для клеточной популяции. Для оценки репродуктивной клеточной гибели традиционно используется колониобразующий (или клоногенный) анализ – метод для определения способности отдельной клетки к образованию колонии из 50 или более её потомков [222]. Первоначально, в 1956 году, Пак и Маркус разработали количественную методику оценки выживаемости линии опухолевых клеток (HeLa) в ответ на высокоэнергетическое рентгеновское излучение [223]. Это исследование выявило существенное дозозависимое снижение репродуктивной способности, скорости роста и колониобразующей способности опухолевых клеток [223]. В настоящее время клоногенный анализ является «золотым стандартом» в радиобиологии. Анализ кривых выживания клеток, облучённых в разных дозах, построенных на основе данных клоногенного анализа, является базовым для оценки радиочувствительности клеток различных органов и тканей (линий клеток), относительной биологической эффективности облучения (типов излучения, условий воздействия), эффективности радиомодификаторов и радиопротекторов и т.д. Изначально для анализа кривых выживания использовали модели, базирующиеся основе теории мишеней одноударная-многомишенная и одноударная-одномишенная). При анализе оценивают следующие параметры: n – экстраполяционное число, которое соответствует значению по вертикальной оси в точке пересечения экстраполированного линейного участка кривой выживаемости с этой осью. В одноударной-многомишенной модели n равно количеству мишеней; D_0 – это доза, при увеличении которой на каждый последующий единичный интервал, выживаемость клеток уменьшается в e раз на линейном участке кривой

выживаемости; D_{37} – доза, при которой выживает 37% облучённых клеток; D_q – доза, соответствующая точке пересечения экстраполированного линейного участка кривой выживаемости с прямой, проведённой параллельно оси абсцисс на уровне 100% выживаемости. D_q характеризует величину «плеча» кривой, которая отражает эффективность пострадиационного восстановления клеток [224]. В настоящее время для анализа кривых выживания используют линейно-квадратичную модель, учитывающую процессы репарации длительности облучения [225]. В линейно-квадратичной модели основными расчётными коэффициентами, определяющими характер кривой выживания клеток, является линейный коэффициент α (гибель клетки обусловлена одним критическим (летальным) повреждением) и квадратичный коэффициент β (гибель клетки обусловлена накоплением сублетальных повреждений) [225]. Соотношение α/β зависит от ширины плеча и часто используется для количественной оценки чувствительности клеток к воздействию ионизирующего излучения [225].

Хотя клоногенный анализ изначально был разработан как инструмент для проверки эффективности воздействия ионизирующего излучения на выживаемость и пролиферацию клеток, позже он широко использовался для оценки эффектов различных цитотоксических, генотоксических агентов и скрининга новых химиотерапевтических препаратов, воздействующих на репродуктивную целостность клеток дозозависимым образом [222]. Кроме того, этот анализ также был использован для определения стволовости опухолевых клеток, выделенных из опухолей, и линий опухолевых клеток [226, 227]. Этот метод помогает оценить способность культивируемых *in vitro* опухолевых стволовых клеток клеточных линий развиваться в новую опухоль при трансплантации реципиенту *in vivo* [228].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. 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.

2.2. 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). Такой подход позволил с одной стороны обеспечить необходимую точность отпускаемых доз (до ± 15 %), а с другой максимально приблизиться к реальным условиям (мощность дозы, энергия тормозных фотонов) рентгеновских диагностических и терапевтических процедур. Облучение проводили при температуре 4°C. Для поддержания необходимой температуры во время облучения использовали термогранулы LAB ARMOR BEADS.

2.3. Иммуноцитохимия

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 пермеабилзации 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 иммуноцитохимически-окрашенных клеток проводили с помощью люминесцентного исследовательского микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Токио, Япония) 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>; доступ получен 19 сентября 2016 г.). Долю Ki-67 негативных, а также каспаза-3 и LC3-II позитивных клеток подсчитывали вручную.

2.4. 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.

2.5. 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. Расчёт эффективности посадки и доли выживших клеток

проводили по общепринятым формулам [229]. Для анализа данных о клоногенной выживаемости использовали стандартную линейно-квадратичную (LQ) модель:

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

где SF – фракция выживших клеток, D – доза облучения (Гр), α и β – линейный и квадратичный эмпирические коэффициенты, соответственно.

2.6. Анализ данных

Статистический анализ данных проводили с использованием программного пакета 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. Для оценки статистической значимости различий использовали критерия Манна-Уитни и t-критерия Стьюдента. Использование t-критерия Стьюдента оправдано тем, что согласно центральной предельной теореме какова бы ни была форма распределения генеральной совокупности, выборочное распределение средних значений всегда стремится к нормальному [230].

Для оценки пороговой дозы полученные наборы данных были проанализированы с использованием модели «hockey stick», позволяющей определить пороговую дозу td , за которой следует линейно-зависимое от дозы увеличение эффекта [231]. Функция имеет вид $y(d) = a + b \times (d - td) \times 1[d > td]$, где d – доза облучения. Проверка оценки параметров a, b и td с соответствующими 95 % доверительными интервалами (CI) и стандартной ошибкой (SE) была проведена с использованием программного обеспечения Wolfram Mathematica 13.0 [232].

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 [37, 233, 234], тогда как через 4 ч после облучения количество фокусов этих белков снижается примерно в 2 раза [37, 233, 234], что, как правило, связывают с окончанием «быстрой» фазы репарации ДР ДНК [37, 233, 234].

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. 7). В этом диапазоне доз зависимости доза-эффект хорошо аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов, x – доза в Гр:

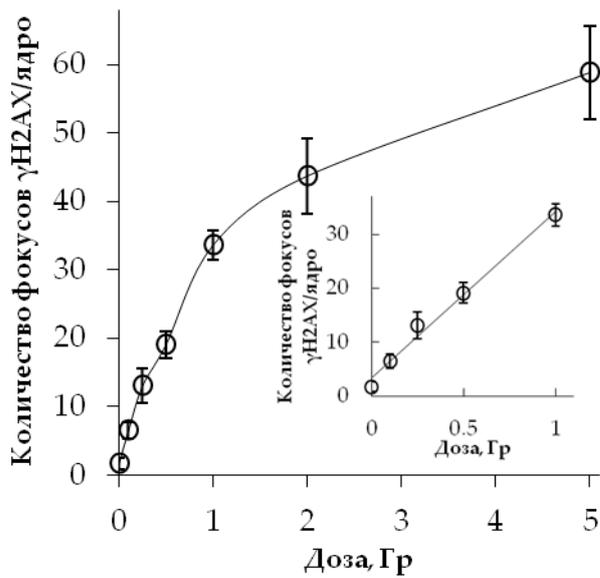
$$\gamma\text{H2AX} - y = 30,83x + 3,41 (R^2 = 0,99);$$

$$53\text{BP1} - y = 26,40x + 2,72 (R^2 = 0,99);$$

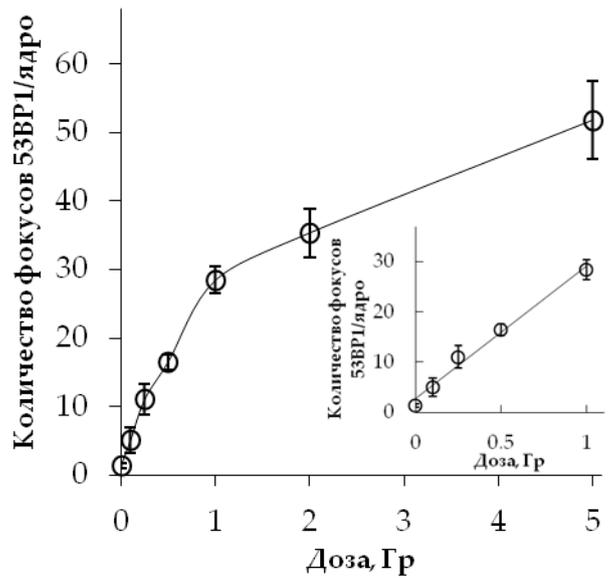
$$p\text{ATM} - y = 20,89x + 2,18 (R^2 = 0,98);$$

$$p\text{-p53(Ser-15)} - y = 16,39x + 0,01 (R^2 = 0,99).$$

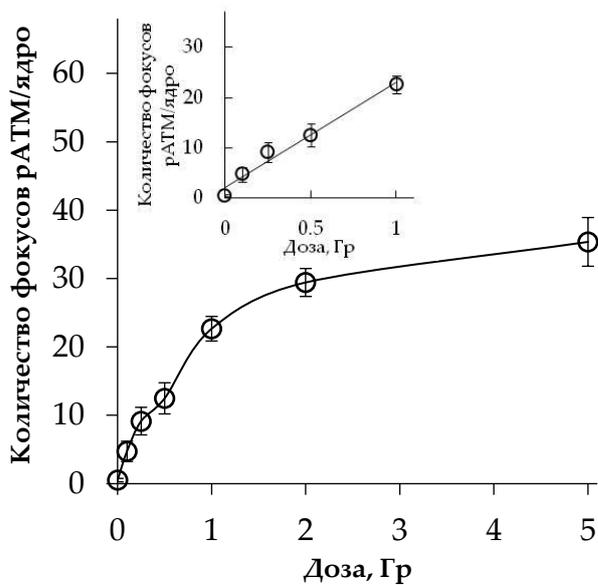
Угловой коэффициент показывает изменение количества фокусов на единицу дозы (Гр). Таким образом, в диапазоне доз от 0,1 до 1 Гр количественный выход радиационно-индуцированных фокусов составил 30,83; 26,40; 20,89 и 16,39 фокусов на клетку в Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15), соответственно. Значения, полученные для наиболее хорошо изученных фокусов белков γ H2AX, 53BP1, pATM, хорошо согласуются с литературными данными [235-237].



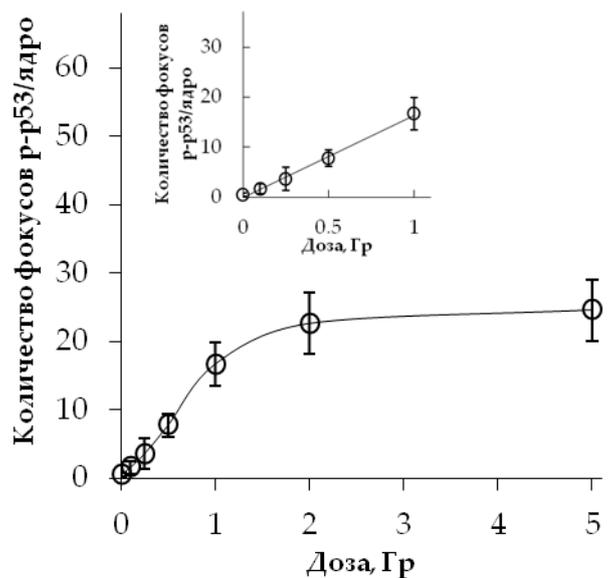
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 7. 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.

При увеличении дозы облучения до 2 и 5 Гр наблюдалось снижение количественного выхода радиационно-индуцированных фокусов (рис. 7). 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 облучения 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 (рис. 8). В этом диапазоне доз зависимости доза-эффект аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов, x – доза в Гр:

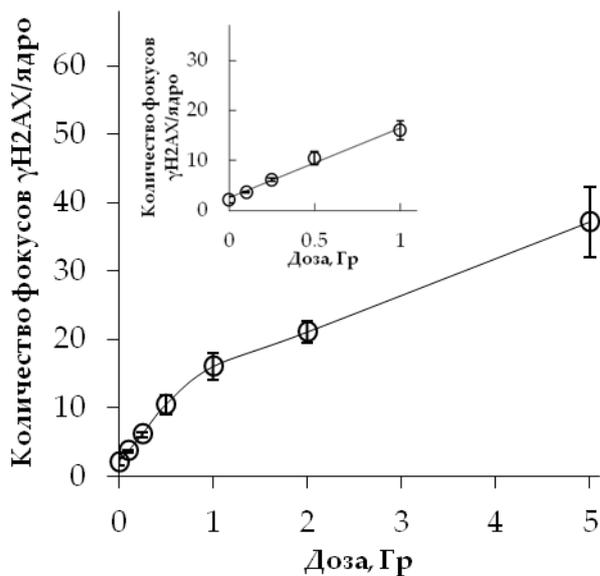
$$\gamma\text{H2AX} - y = 14,00x + 2,52 (R^2 = 0,99);$$

$$53\text{BP1} - y = 12,69x + 1,88 (R^2 = 0,99);$$

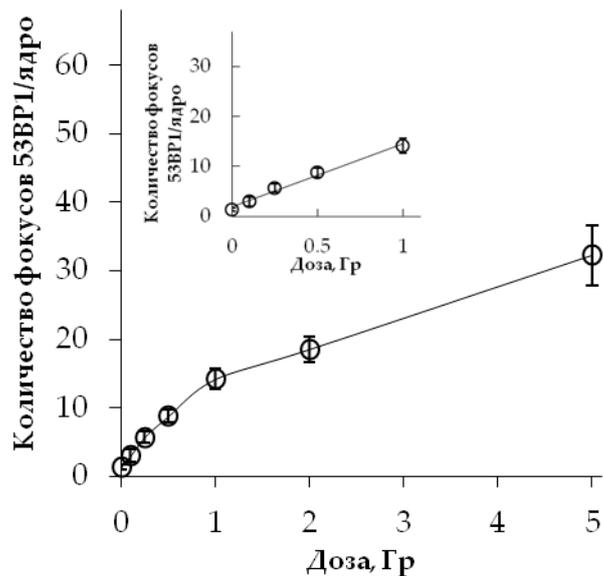
$$p\text{ATM} - y = y = 11,96x + 1,71 (R^2 = 0,97);$$

$$p\text{-p53(Ser-15)} - y = 16,26x + 0,37 (R^2 = 0,99)$$

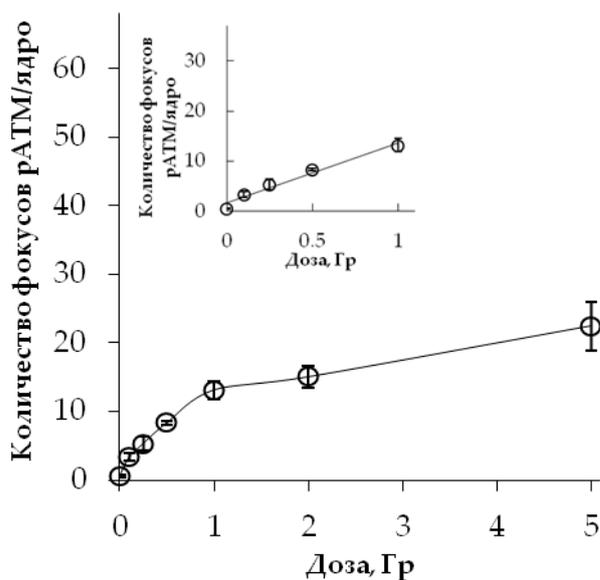
Таким образом, в диапазоне доз от 0,1 до 1 Гр количественный выход радиационно-индуцированных фокусов составил 14; 12,69; 11,96 и 16,26 фокусов на клетку на 1 Гр для γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) соответственно. После облучения в дозе 2 Гр количественный выход фокусов составил 10,55; 9,27; 7,52 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.



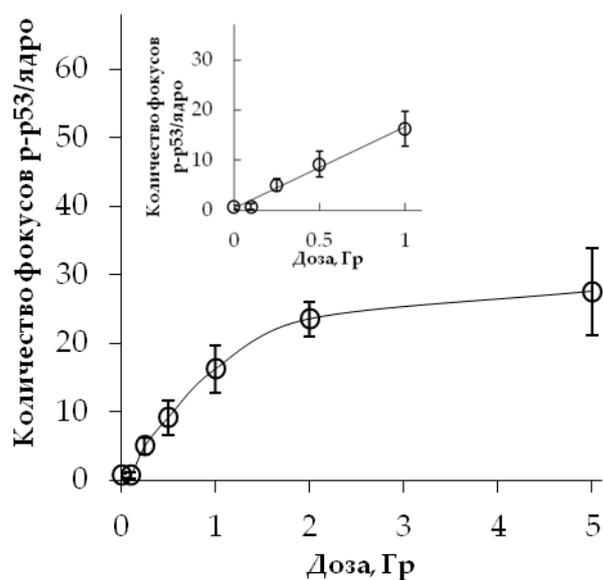
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 8. Дозовые зависимости для фокусов репарации ДНК, подсчитанных через 4 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.

Снижение количественного выхода фокусов после облучения может быть отражением как биологических процессов (слиянием отдельнолежащих фокусов с образованием более крупных «центров» репарации или увеличением скорости репарации ДНК в ущерб её корректности), так и несовершенством использованной нами 2D микроскопии (в 2D проекции объемного ядра вышележащий фокус закрывает нижележащий). Поэтому нами было проведено сравнение количественного выхода фокусов в диапазоне доз только до 1 Гр. Для удобства восприятия количественный выход фокусов белков γ H2AX, pATM, 53BP1 и p-p53(Ser-15), через 0,5 и 4 ч после воздействия рентгеновского излучения в дозах от 0,1 до 1 Гр представлен в таблице 2. Видно, что через 4 часа после облучения количественный выход фокусов γ H2AX, pATM, 53BP1 уменьшался в ~ 2 раза. Однако в случае с фокусами p-p53(Ser-15) существенного изменения количественного выхода фокусов не наблюдалось.

Таблица 2. Количественный выход фокусов белков γ H2AX, pATM, 53BP1 и p-p53(Ser-15) (фокусы/клетка на 1 Гр), через 0,5 и 4 ч после облучения в дозах от 0,1 до 1 Гр.

Белок	Время после облучения, ч	
	0,5	4
γH2AX	30,83±1,93	14,00±0,84
53BP1	26,40±1,71	12,69±0,78
pATM	20,89±1,80	11,96±1,17
p-p53	16,39±0,62	16,26±1,17

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

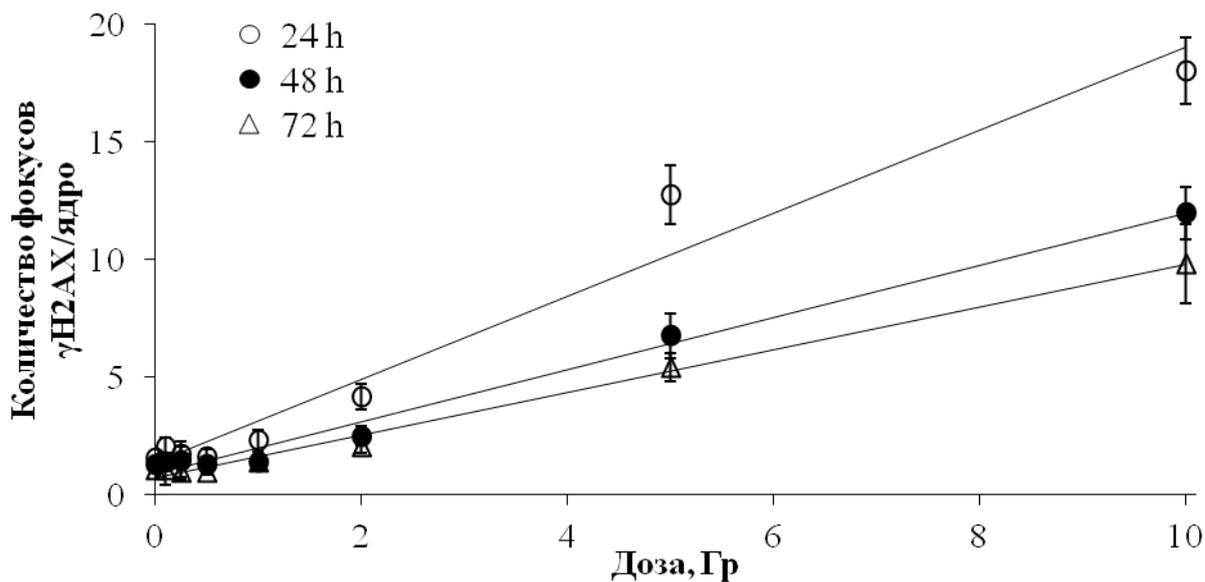
Через 24 ч после облучения основные процессы репарации ДНК заканчиваются и остается лишь незначительное количество от первичных радиационно-индуцированных ДР ДНК. Изучение таких остаточных повреждений ДНК представляет особый интерес для радиационной биологии, так как они приводят к гибели или потере 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

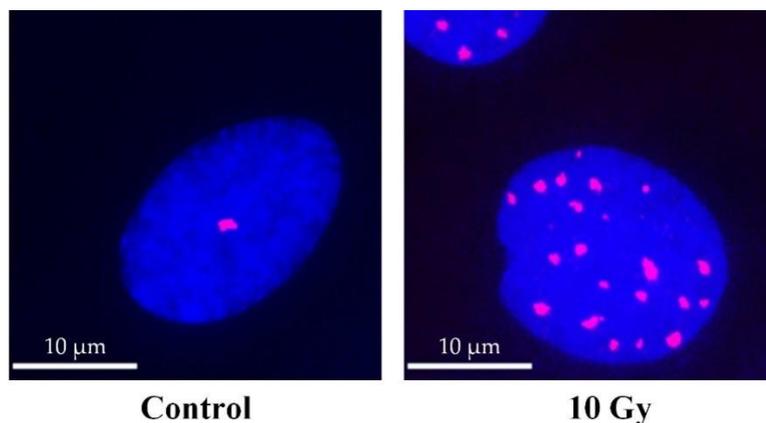
Линейная беспороговая модель является наиболее простой математической моделью для описания количественных зависимостей изменения эффекта от дозы излучения. Традиционно её используют для описания дозовых зависимостей стохастических эффектов облучения [238]. Несмотря на серьезные споры о правомочности использования этой модели оценки риска радиационного канцерогенеза [239, 240], она, во многом в силу своей простоты, является базовой для регулирующих органов (МКРЗ, НКДР и т.д.) [241]. 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. 9).



(a)

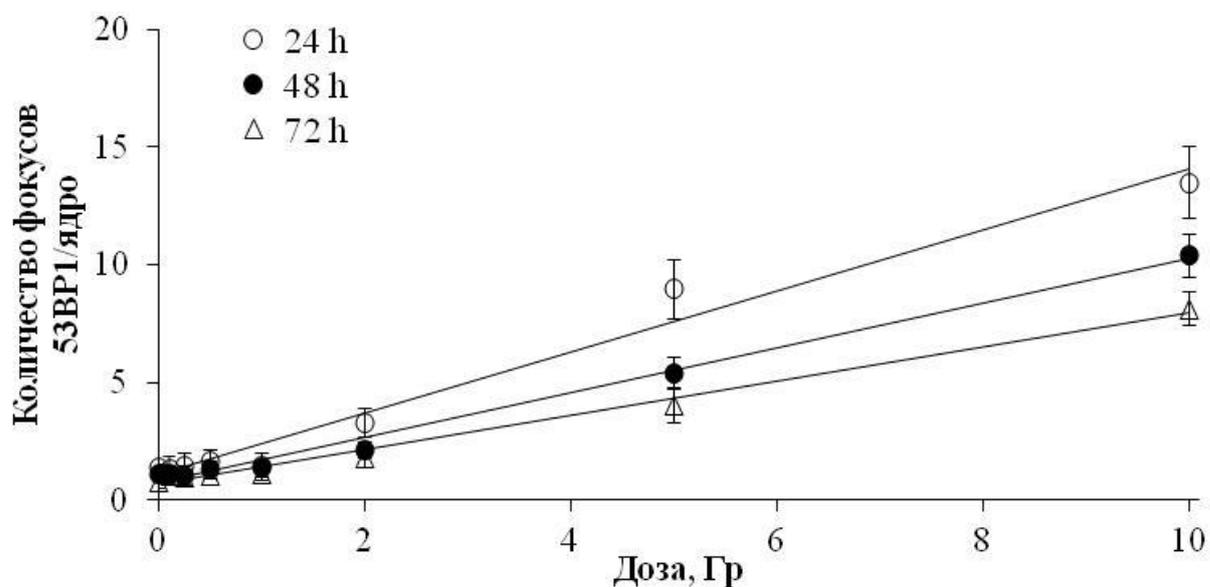


(б)

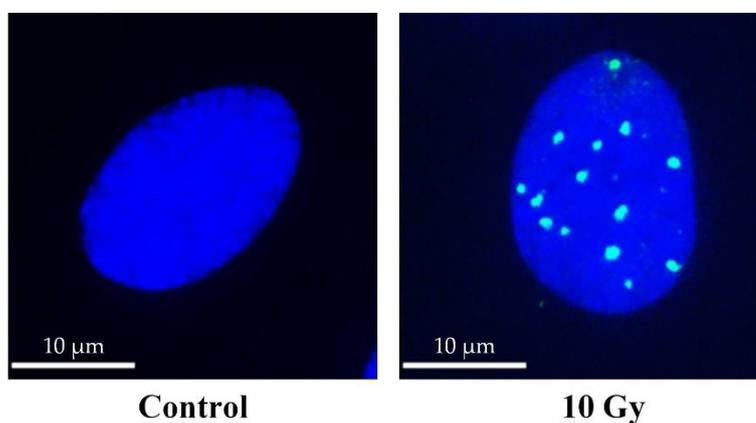
Рисунок 9. (а) Изменения количества фокусов γH2AX в фибробластах человека через 24, 48 и 72 часа после воздействия рентгеновского излучения в различных дозах. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. (б) Репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер контрольных и облучённых в дозе 10 Гр (24 ч) клеток (синий – клеточные ядра, красный – фокусы γH2AX).

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).

На рис. 10 представлены изменения количества остаточных фокусов 53BP1 от поглощенной дозы в различное время после облучения. 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 (рис. 10). В период с 24 по 72 ч отмечается уменьшение количества остаточных фокусов в $\sim 1,7$ раза.



(а)

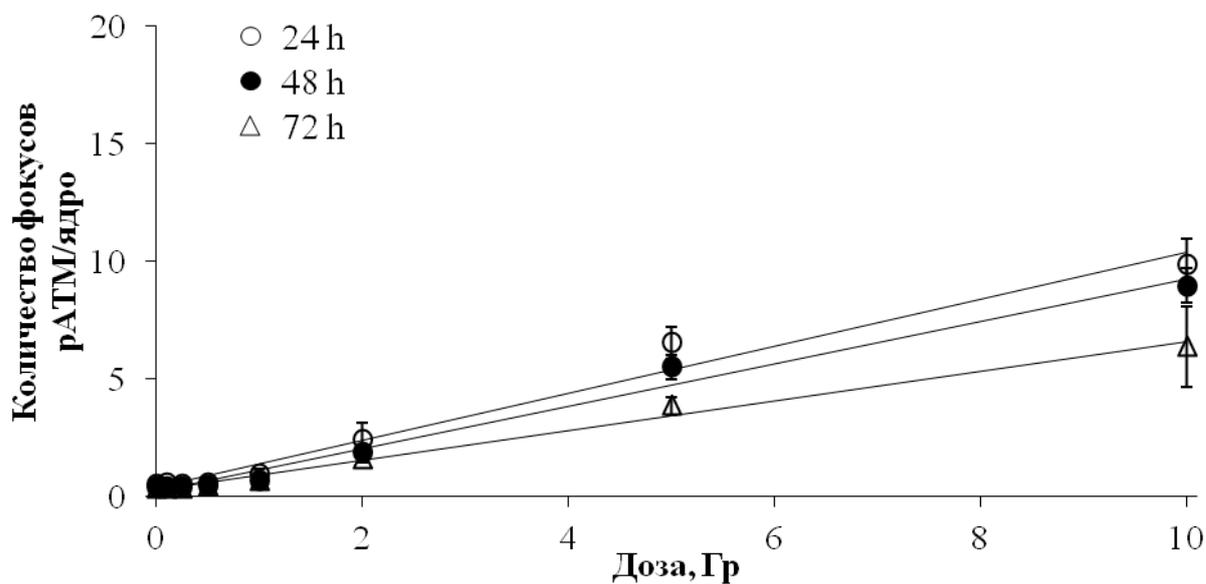


(б)

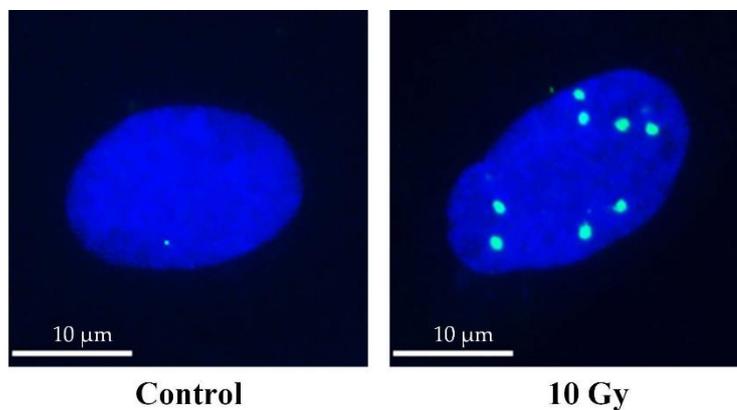
Рисунок 10. (а) Изменения количества фокусов 53BP1 в фибробластах человека через 24, 48 и 72 часа после воздействия рентгеновского излучения в различных дозах. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. (б) Репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных ядер контрольных и облучённых в дозе 10 Гр (24 ч) клеток (синий – клеточные ядра, зеленый – фокусы 53BP1).

Изменения количества остаточных фокусов pATM через 24, 48 и 72 ч после облучения в дозах 0,1-10 Гр представлены на рис. 11. 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 ~ в 1,6 раза.



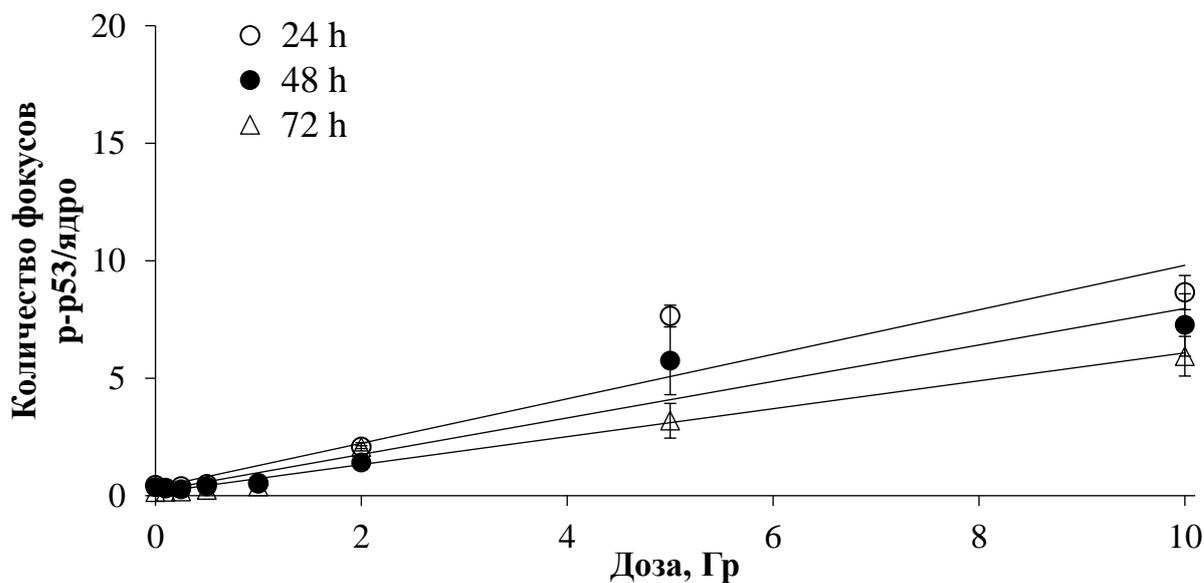
(a)



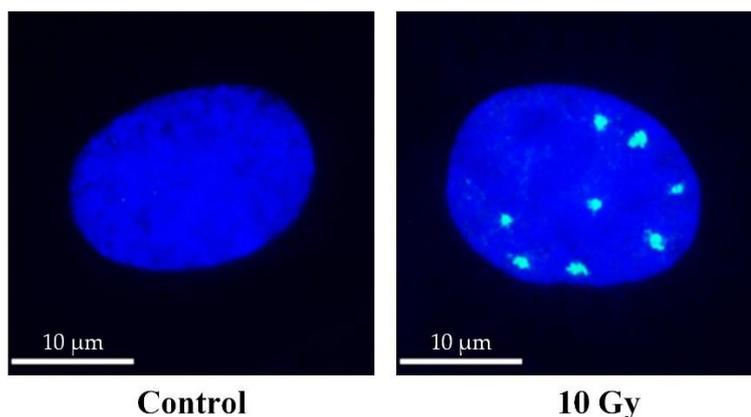
(б)

Рисунок 11. (а) Изменения количества фокусов рАТМ в фибробластах человека через 24, 48 и 72 часа после воздействия рентгеновского излучения в различных дозах. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. (б) Репрезентативные микрофотографии ядер контрольных и облучённых 10 Гр (24 ч) клеток (синий – клеточные ядра, зеленый – фокусы рАТМ).

На рис. 12 представлены зависимости изменений количества остаточных фокусов p-p53(Ser-15) через после облучения в различных дозах.



(a)



(б)

Рисунок 12. (а) Изменения количества фокусов p-p53(Ser-15) в фибробластах человека через 24, 48 и 72 часа после воздействия рентгеновского излучения в различных дозах. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. (б) Репрезентативные микрофотографии ядер контрольных и облучённых 10 Гр (24 ч) клеток (синий – клеточные ядра, зеленый – фокусы 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. 12). Как и в случае остаточных фокусов pATM, с увеличением времени после облучения количественный выход фокусов p-p53(Ser-15) уменьшается в период с 24 до 72ч ~ в 1,6 раза.

В таблице 3 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 3. 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» [231].

Дозовые зависимости для фокусов γH2AX , полученные через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения, показаны на рис. 13.

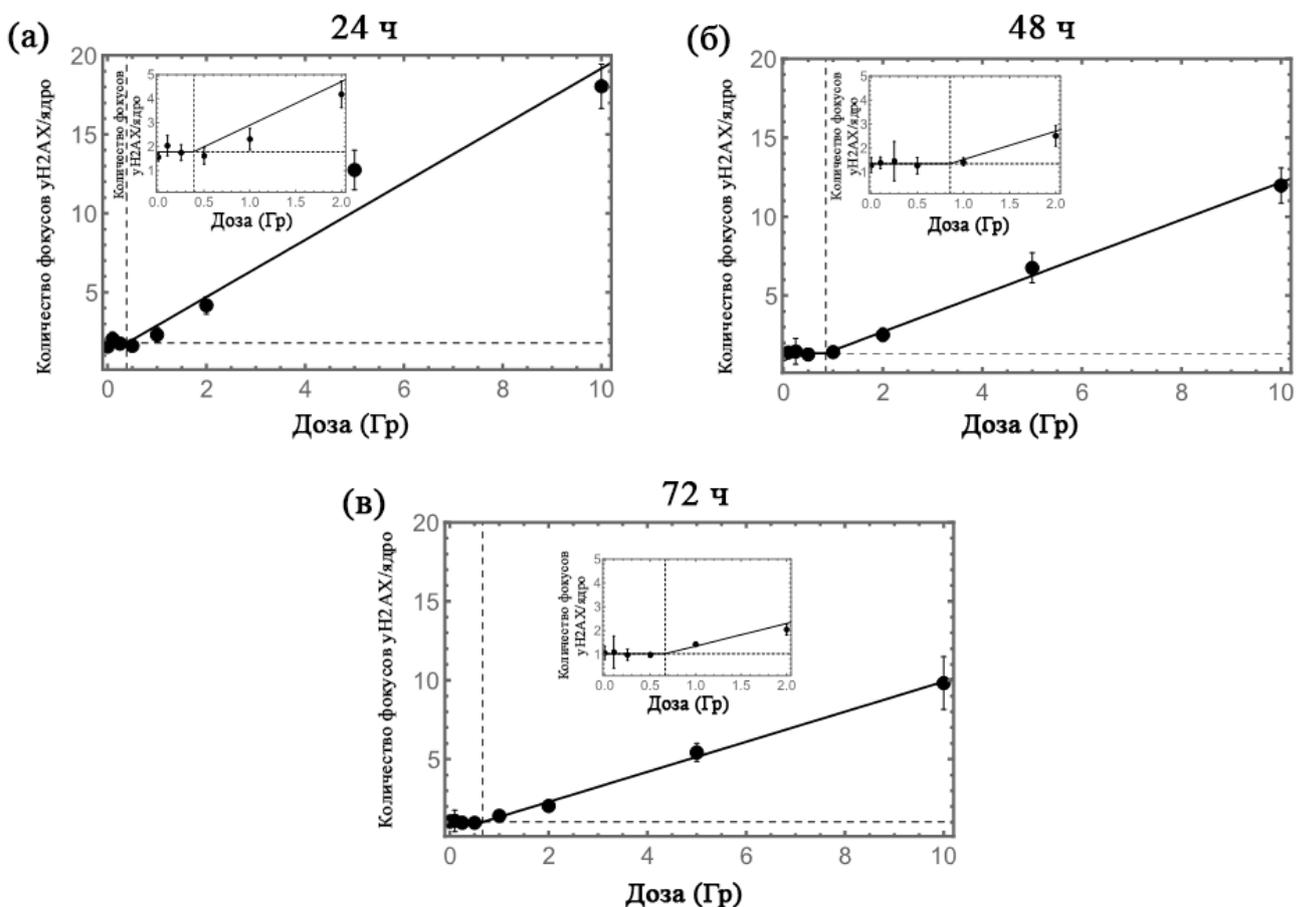


Рисунок 13. Дозовые зависимости для количества остаточных фокусов γH2AX , подсчитанных (а) через 24 ч, (б) через 48 ч и (в) через 72 ч после облучения (средние значения \pm SE), и графики, сгенерированные с помощью модели «hockey stick» для анализа экспериментально полученных наборов данных (сплошные линии). Пересечение пунктирных линий указывает точку, где кривые зависимости доза-эффект переключаются с «плато» на линейно зависящие от дозы. Вставки представляют меньший диапазон доз 0-2 Гр, показывающий пороговую область зависимости доза-эффект.

Анализ данных дозовых зависимостей с использованием «hockey stick» модели позволяет получить уравнения со следующими параметрами:

$$y_{\gamma H2AX, 24h}(d) = 1,783 + 1,809 \times (d - 0,385) \times 1_{[d > 0,385]},$$

$$y_{\gamma H2AX, 48h}(d) = 1,355 + 1,183 \times (d - 0,855) \times 1_{[d > 0,855]},$$

$$y_{\gamma H2AX, 72h}(d) = 1,023 + 0,952 \times (d - 0,664) \times 1_{[d > 0,664]},$$

что дает пороговые дозы 0,385 Gy (SE = 0,625; CI ∈ [-1,222, 1,992], $p = 5,7 \times 10^{-1}$) для набора данных на 24 ч, 0,855 Gy (SE = 0,199; CI ∈ [0,342, 1,367], $p = 7,8 \times 10^{-3}$) для набора данных на 48 ч и 0,664 Gy (SE = 0,171; CI ∈ [0,223, 1,104], $p = 1,2 \times 10^{-2}$) для набора данных на 72 ч после облучения.

Дозовые зависимости для фокусов 53BP1 показаны на рис. 14. Анализ с использованием «hockey stick» модели дает следующие параметры:

$$y_{53BP1, 24h}(d) = 1,392 + 1,326 \times (d - 0,378) \times 1_{[d > 0,378]},$$

$$y_{53BP1, 48h}(d) = 1,159 + 1,015 \times (d - 0,867) \times 1_{[d > 0,867]},$$

$$y_{53BP1, 72h}(d) = 0,999 + 0,796 \times (d - 1,054) \times 1_{[d > 1,054]},$$

что дает пороговые дозы 0,378 Gy (SE = 0,092; CI ∈ [-0,925, 1,682], $p = 5,0 \times 10^{-1}$) для набора данных на 24 ч, 0,867 Gy (SE = 0,115; CI ∈ [0,573, 1,161], $p = 6,4 \times 10^{-4}$) для набора данных на 48 ч и 1,054 Gy (SE = 0,191; CI ∈ [0,563, 1,545], $p = 2,7 \times 10^{-3}$) для набора данных на 72 ч после облучения.

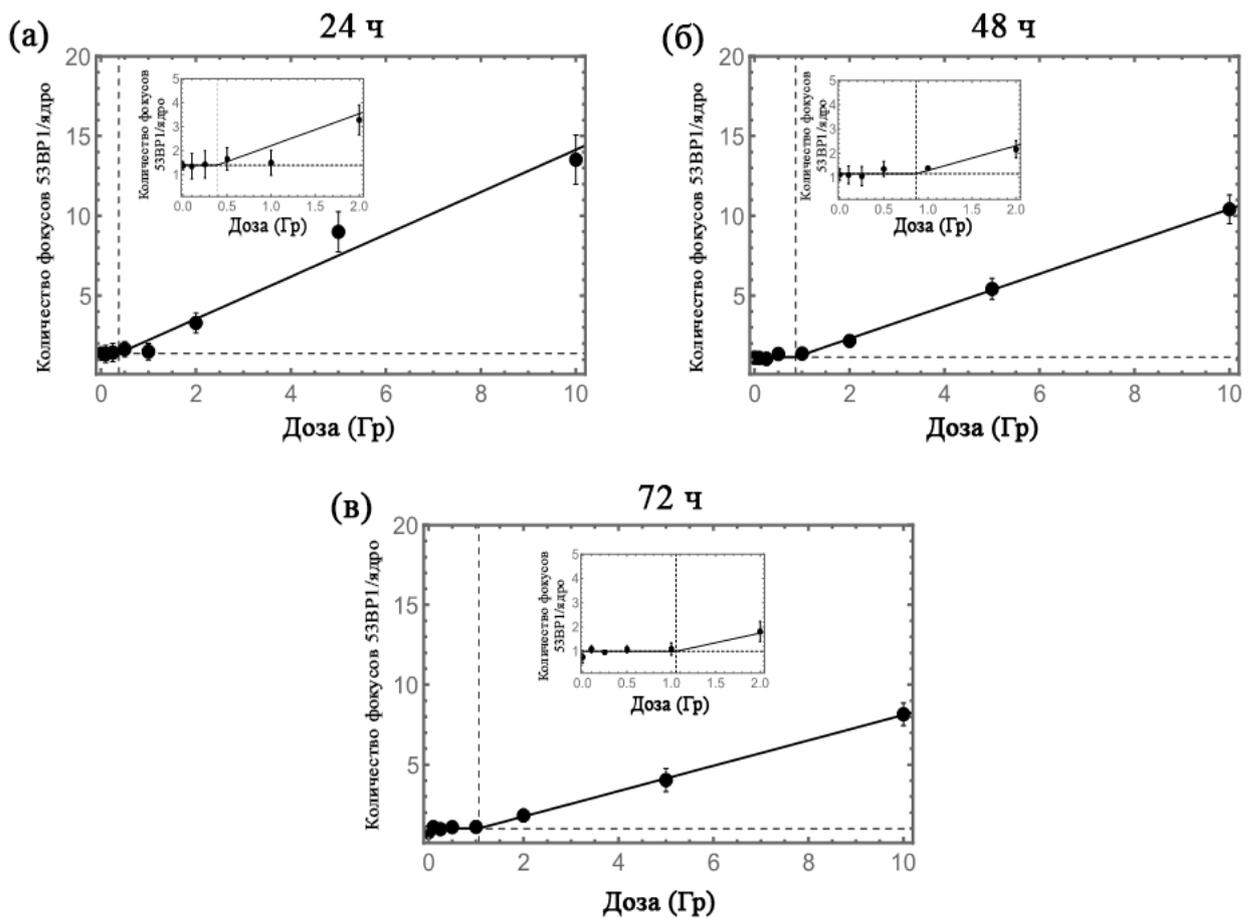


Рисунок 14. Дозовые зависимости для количества остаточных фокусов 53BP1, подсчитанных (а) через 24 ч, (б) через 48 ч и (в) через 72 ч после облучения (средние значения \pm SE), и графики, сгенерированные с помощью модели «hockey stick» для анализа экспериментально полученных наборов данных (сплошные линии). Пересечение пунктирных линий указывает точку, где кривые зависимости доза-эффект переключаются с «плато» на линейно зависящие от дозы. Вставки представляют меньший диапазон доз 0-2 Гр, показывающий пороговую область зависимости доза-эффект.

Дозовые зависимости для остаточных фокусов pATM, посчитанных через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения, показаны на рис. 15. Наилучшее соответствие «hockey stick» модели дают следующие значения параметров:

$$\begin{aligned}
 y_{pATM, 24h}(d) &= 0,542 + 1,008 \times (d - 0,207) \times 1_{[d > 0,207]}, \\
 y_{pATM, 48h}(d) &= 0,421 + 0,923 \times (d - 0,341) \times 1_{[d > 0,341]}, \\
 y_{pATM, 72h}(d) &= 0,376 + 0,637 \times (d - 0,205) \times 1_{[d > 0,205]},
 \end{aligned}$$

что дает пороговые дозы 0,207 Gy ($SE = 0,547$; $CI \in [-1,198, 1,612]$, $p = 7,2 \times 10^{-1}$) для набора данных на 24 ч, 0,341 Gy ($SE = 0,378$; $CI \in [-0,631, 1,312]$, $p = 4,1 \times 10^{-1}$) для набора данных на 48 ч и 0,205 Gy ($SE = 0,344$; $CI \in [-0,680, 1,089]$, $p = 5,8 \times 10^{-1}$) для набора данных на 72 ч после облучения.

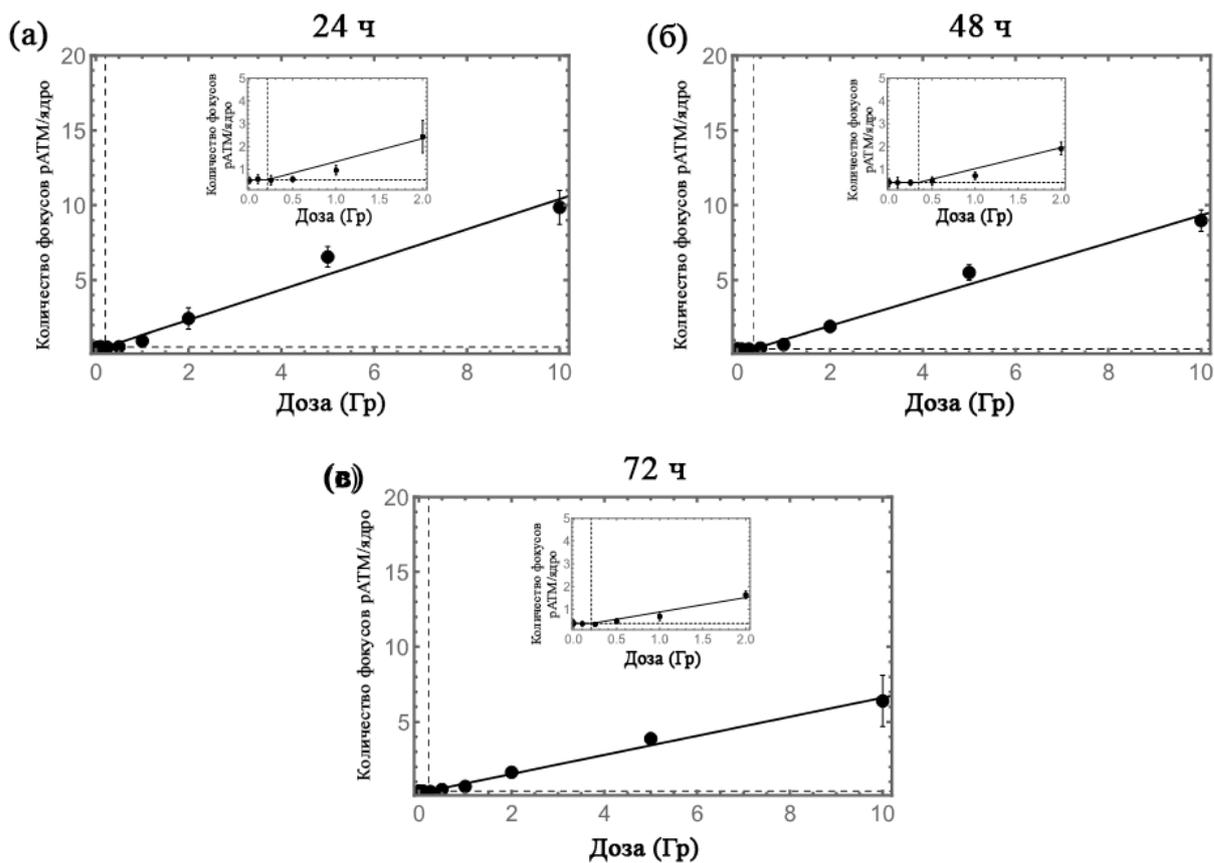


Рисунок 15. Дозовые зависимости для количества остаточных фокусов рАТМ, подсчитанных (а) через 24 ч, (б) через 48 ч и (в) через 72 ч после облучения (средние значения $\pm SE$), и графики, сгенерированные с помощью модели «hockey stick» для анализа экспериментально полученных наборов данных (сплошные линии). Пересечение пунктирных линий указывает точку, где кривые зависимости доза-эффект переключаются с «плато» на линейно зависящие от дозы. Вставки представляют меньший диапазон доз 0-2 Гр, показывающий пороговую область зависимости доза-эффект.

Дозовые зависимости для остаточных фокусов p-p53(Ser-15), подсчитанных через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения, показаны на рис. 16.

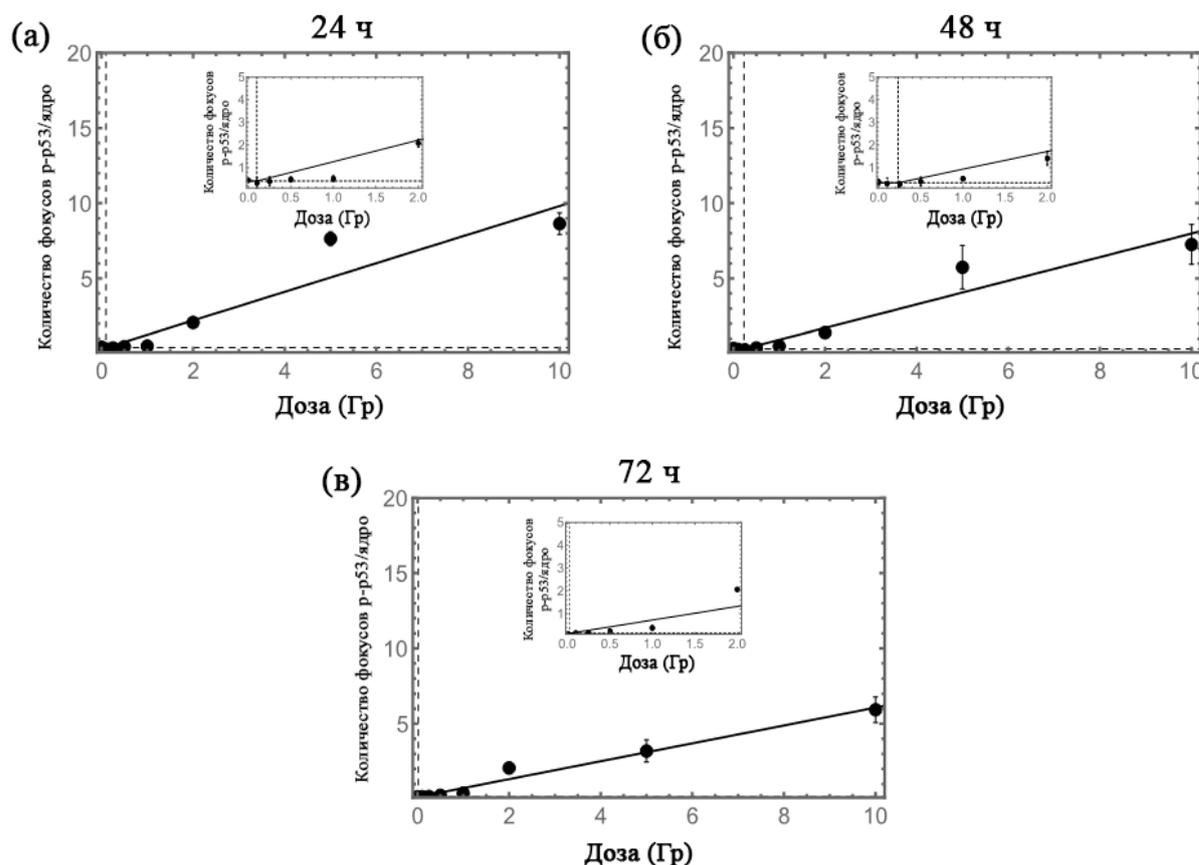


Рисунок 16. Дозовые зависимости для количества остаточных фокусов p-p53(Ser-15), подсчитанных (a) через 24 ч, (b) 48 ч и (c) 72 ч после облучения (средние значения \pm SE), и графики, сгенерированные с помощью модели «hockey stick» для анализа экспериментально полученных наборов данных (сплошные линии). Пересечение пунктирных линий указывает точку, где кривые зависимости доза-эффект переключаются с «плато» на линейно зависящие от дозы. Вставки представляют меньший диапазон доз 0-2 Гр, показывающий пороговую область зависимости доза-эффект.

Наилучшее соответствие «hockey stick» модели дают следующие значения параметров:

$$y_{p-p53, 24h}(d) = 0,411 + 0,950 \times (d - 0,100) \times 1_{[d > 0,100]},$$

$$y_{p-p53, 48h}(d) = 0,332 + 0,784 \times (d - 0,231) \times 1_{[d > 0,231]},$$

$$y_{p-p53, 72h}(d) = 0,145 + 0,595 \times (d - 0,019) \times 1_{[d > 0,019]},$$

что дает пороговые дозы 0,100 Gy (SE = 1,541; CI ∈ [-3,860, 4,060], $p = 9,5 \times 10^{-1}$) для набора данных на 24 ч, 0,231 Gy (SE = 0,961; CI ∈ [-2,240, 2,702], $p = 8,2 \times 10^{-1}$) для набора данных на 48 ч и 0,019 Gy (SE = 0,722; CI ∈ [-1,836, 1,874], $p = 9,8 \times 10^{-1}$) для набора данных на 72 ч после облучения.

Пороговые дозы для остаточных фокусов γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) суммированы в таблице 4. В целом, наличие статистически значимого дозового порога было показано только для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения.

Таблица 4. Пороговые дозы (Гр) для остаточных фокусов γ H2AX, 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
γ H2AX	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 *** $p < 0,001$

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 γ H2AX, показаны на рис. 17. Полученные зависимости «доза-эффект» близки к зависимостям, полученным при подсчете фокусов без учета совместной локализации с γ H2AX. Однако количественный выход колокализованных фокусов был несколько ниже (таблица 5). Через 24 ч после облучения ~ 65-70% фокусов γ H2AX были колокализованы с фокусами 53BP1, тогда как через 48 и 72 ч эти значения составляли около 70-80%. Характер изменений доли колокализованных фокусов γ H2AX с фокусами pATM и p-p53(Ser-15) был сходным. Через 24 ч после облучения только 45-50% фокусов γ H2AX были колокализованы 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 колокализованы с фокусами pATM или p-p53(Ser-15).

Таблица 5. Выход фокусов 53BP1, pATM, и p-p53(Ser-15), локализованных 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

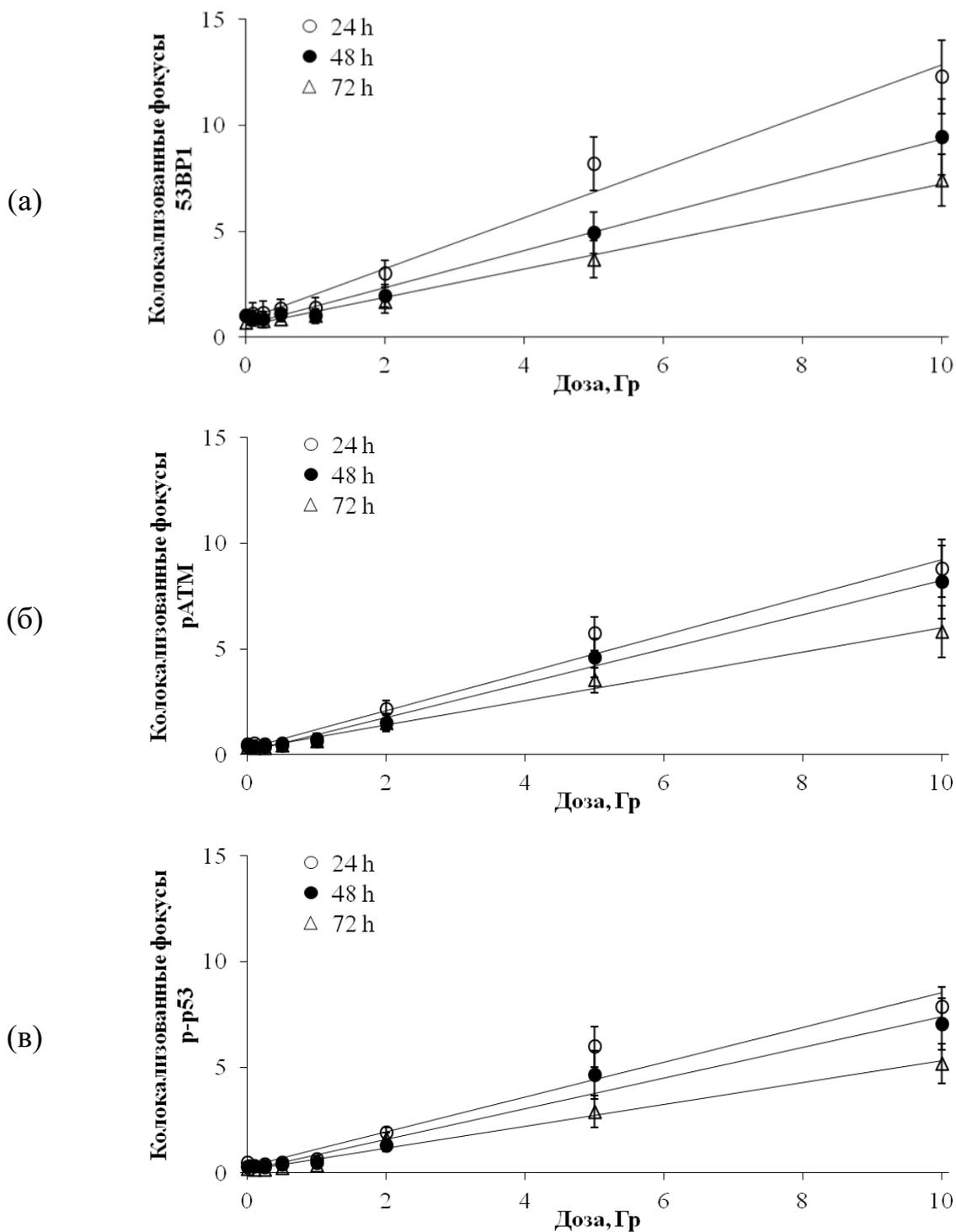


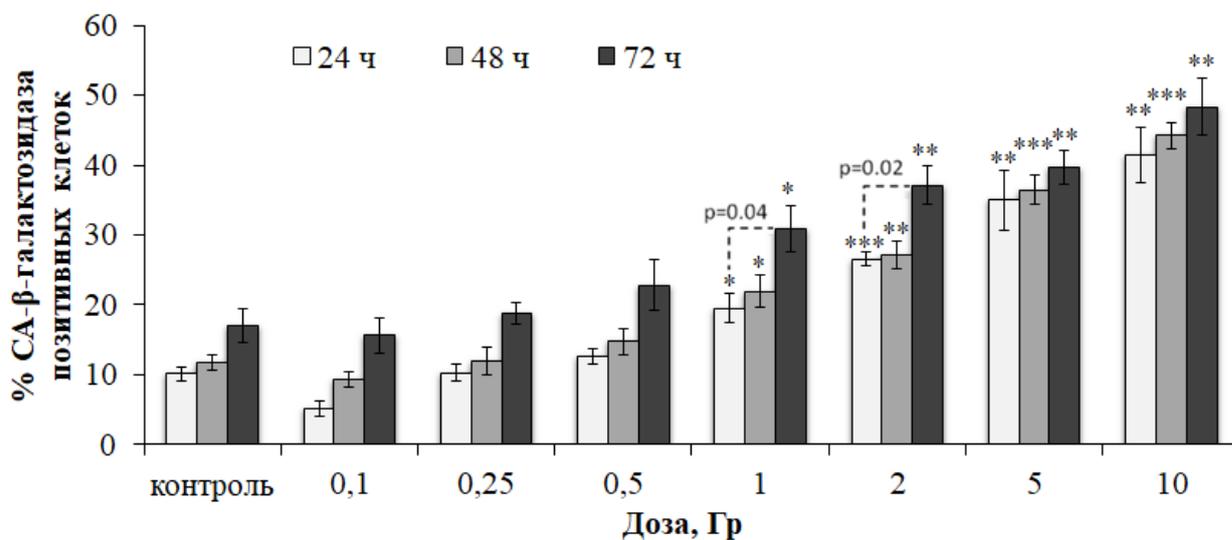
Рисунок 17. Дозовые зависимости изменения количества фокусов 53BP1 (а), pATM (б) и p-p53(Ser-15) (в), локализованных совместно с фокусами γ H2AX в фибробластах человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

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

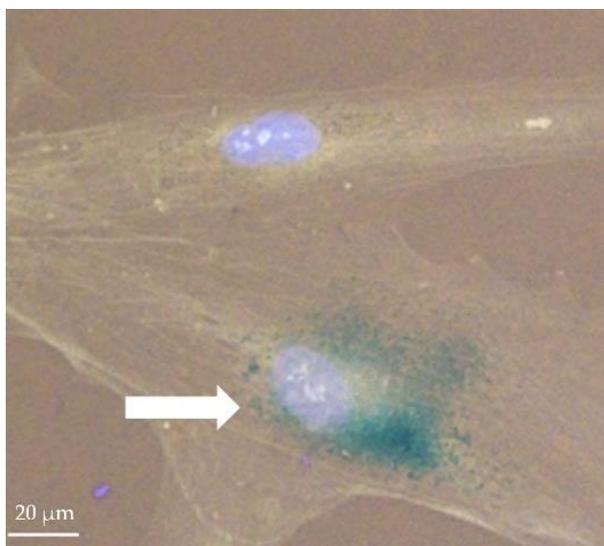
3.3.1. Изменения доли СА-β-галактозидаза позитивных клеток

Для оценки изменений доли стареющих клеток в облучённых 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 [242, 243].

Результаты представлены на рис. 18. 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. 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: $y = 2,84 x + 16,32$ ($R^2 = 0,85$) и $y = 2,94 x + 17,75$ ($R^2 = 0,88$), соответственно. Через 72 ч было отмечено линейное увеличение доли СА-β-галактозидаза позитивных клеток при дозах до 2 Гр, после чего наблюдался эффект «плато».



(а)

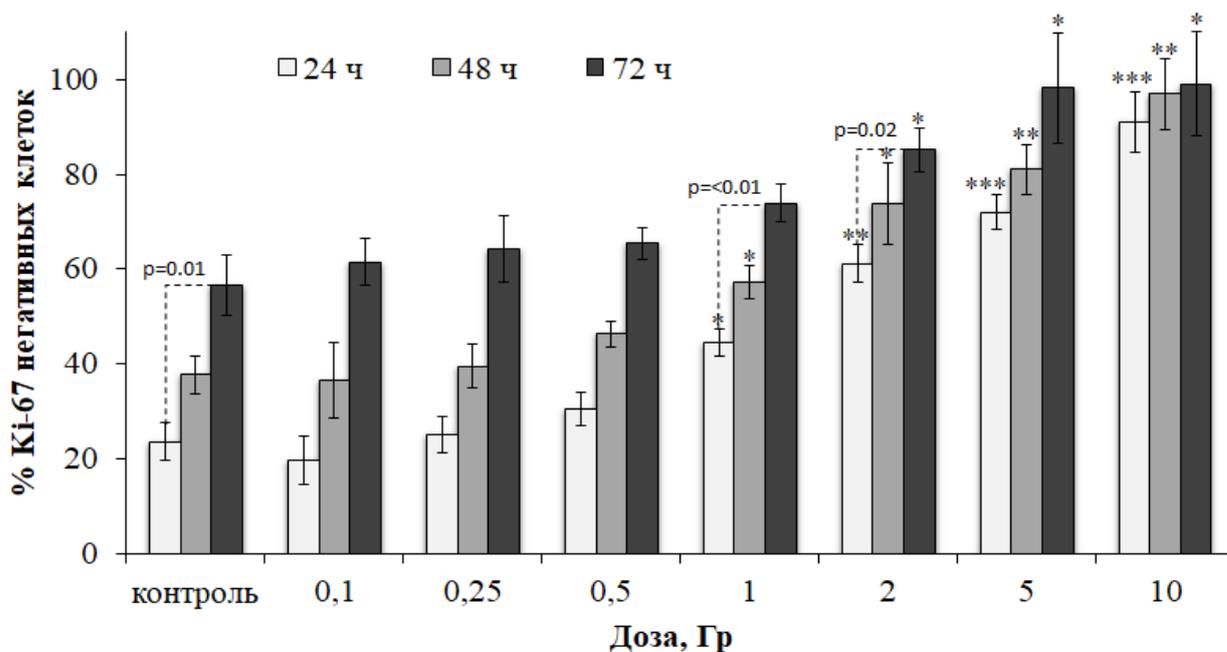


(б)

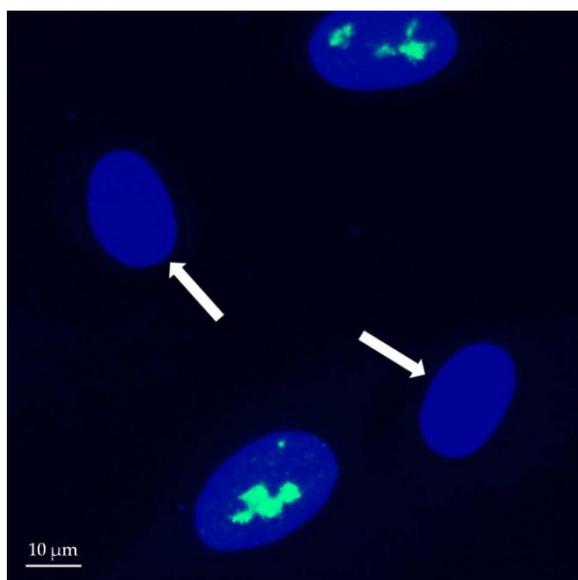
Рисунок 18. (а) Дозовые зависимости изменения доли стареющих клеток (СА-β-галактозидаза позитивных) в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ – 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.

3.3.2. Изменения доли Ki-67 негативных клеток

Результаты подсчета доли Ki-67 негативных клеток в популяциях контрольных и облучённых фибробластов представлены на рис. 19. Белок Ki-67 экспрессируется в клетках во время интерфазы с максимумом в фазах S и G2, а также митоза (M) и практически отсутствует в покоящихся и стареющих клетках [244, 245]. Ki-67 участвует в организации гетерохроматина, сегрегации митотических хромосом и биогенезе рибосом [245, 246]. 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. 19). Примечательно, что клетки высевали в чашки Петри 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 (рис. 19) из-за остановки клеточного цикла и потери способности к делению. Наиболее выраженный эффект наблюдался через 72 ч после облучения (рис. 19). Линейно-зависимое от дозы рентгеновского излучения увеличение доли Ki-67 негативных клеток 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. 19). В клетках, облучённых в дозе 10 Гр, практически отсутствует пролиферативная активность. В целом, полученные результаты хорошо коррелируют с изменениями доли СА-β-галактозидаза позитивных клеток в популяциях облучённых фибробластов.



(a)



(б)

Рисунок 19. (а) Дозовые зависимости изменения фракции Ki-67 негативных клеток в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения. Результаты 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).

Было интересно дополнительно проанализировать остаточные фокусы γ H2AX только в покоящихся (Ki-67 негативных) фибробластах. Результаты представлены на рис. 20.

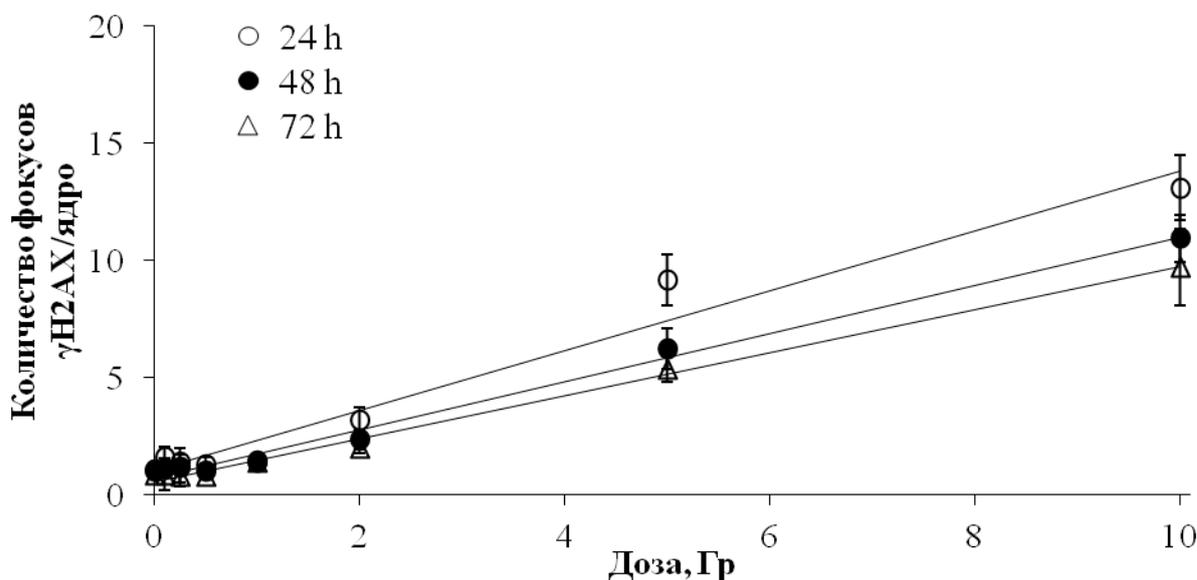


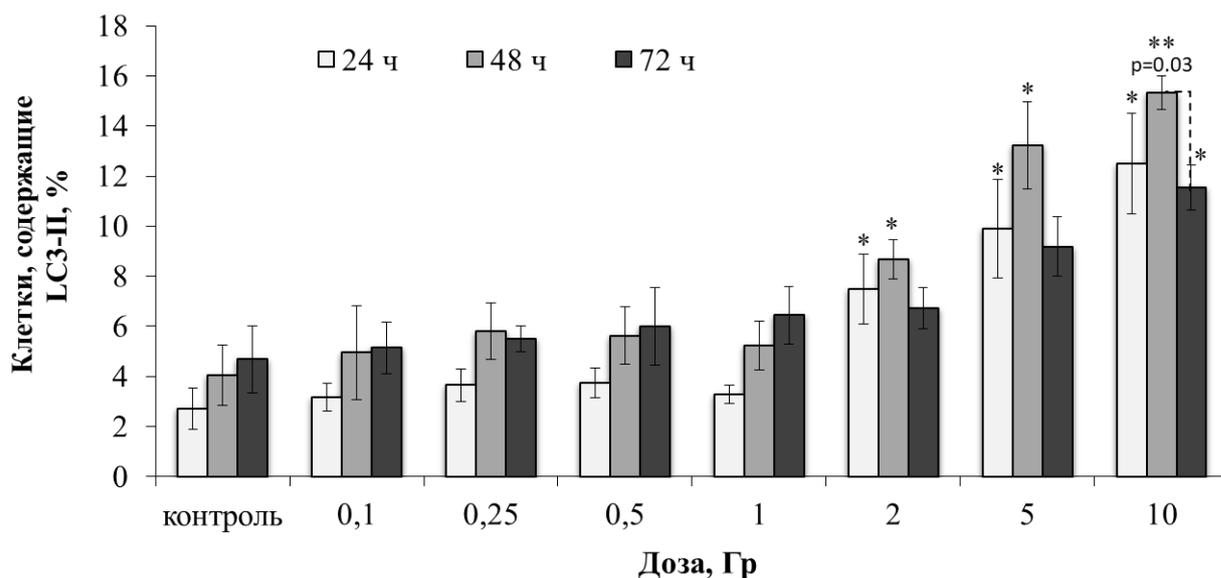
Рисунок 20. Дозозависимые изменения количества остаточных фокусов γ H2AX в Ki-67 негативных фибробластах человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

Математический анализ полученных результатов показал, что зависимости доза-эффект через 24, 48 и 72 ч после облучения аппроксимируются линейными уравнениями, где y – количество фокусов γ H2AX, x – доза в Гр: $y = 1,29x + 0,96$ ($R^2 = 0,96$), $y = 1,04x + 0,66$ ($R^2 = 0,99$) и $y = 0,92x + 0,57$ ($R^2 = 0,99$), соответственно. Таким образом, количественный выход остаточных фокусов γ H2AX в покоящихся клетках через 24 ч после облучения был значительно ниже, чем в общей популяции клеток (1,29 и 1,76 фокусов/клетка на 1 Гр, соответственно). При снижении пролиферативной активности к 72 ч после облучения, когда большинство клеток, особенно

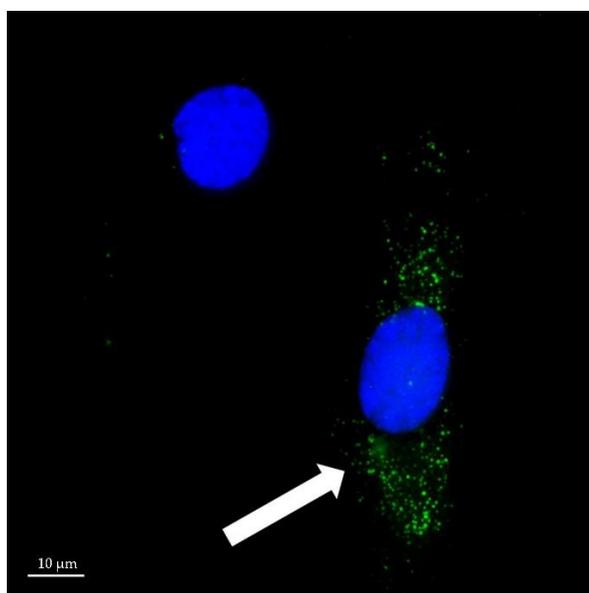
облучённых в дозах 5 и 10 Гр, находились в состоянии покоя, численные значения количественного выхода не различались.

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 аутофагосомальными мембранами [247]. Во время аутофагии цитозольная форма LC3 (LC3-I) конъюгируется с фосфатидилэтаноламином с образованием конъюгата LC3-фосфатидилэтаноламина (LC3-II), который встраивается в мембраны образующихся аутофагосом [248]. При иммуноцитохимическом окрашивании на LC3-II аутофагосомы визуализируются в виде точечных (гранулярных/везикулярных) компартментов цитоплазмы, что позволяет легко дифференцировать аутофагические клетки. Результаты анализа изменений доли аутофагических (LC3-II позитивных) клеток в облучённых клетках показаны на рис. 21. 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. 21).



(а)

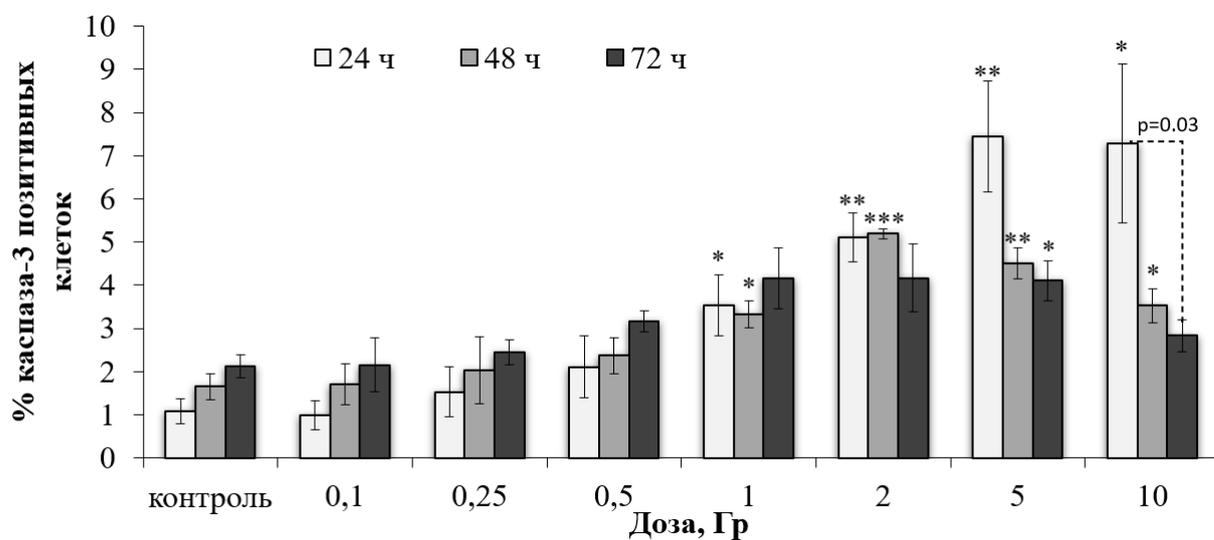


(б)

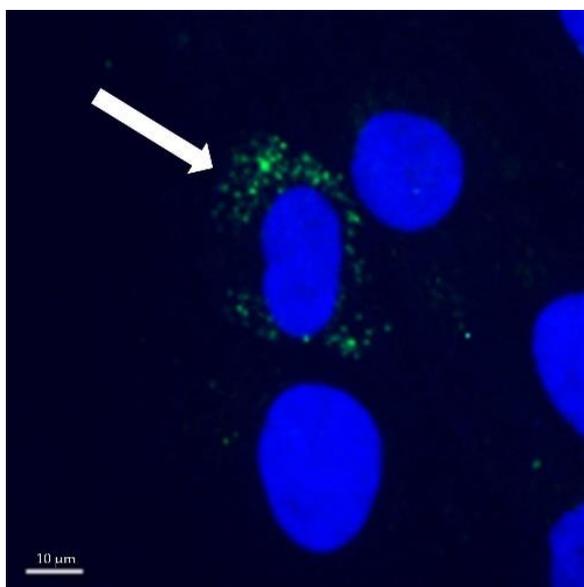
Рисунок 21. (а) Дозовые зависимости изменения фракции клеток, позитивных по LC3-II, в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE. * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ – значимость различий по сравнению с соответствующим контролем. (б) Репрезентативная микрофотография иммуноцитохимически окрашенных на LC3-II клеток. LC3-II позитивная клетка с пунктатом LC3-II (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 [249]. Однако функции каспазы-3 гораздо шире, в частности, она важна для регуляции процессов аутофагии [250] и баланса между процессами гибели и старения клеток [251]. Согласно последним данным, расщепление каспазой-3 специфических белков-мишеней также регулирует контроль клеточного цикла, дифференцировку и онкогенез [252]. Исходя из этого, представлялось важным провести оценку изменений доли каспаза-3 позитивных клеток в популяциях облучённых фибробластов. Результаты исследования представлены на рисунке 16. Было показано, что 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. 22). То есть в эти моменты времени изменение доли клеток, позитивных по каспазе-3, нелинейно зависело от дозы облучения.



(а)



(б)

Рисунок 22. (а) Дозовые зависимости изменения фракции каспаза-3 позитивных клеток, в популяциях фибробластов человека через 24 ч, 48 ч и 72 ч после облучения. Результаты 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

В таблице 5 представлены результаты корреляционного анализа между всеми исследуемыми показателями. 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 (таблица 5). 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 статистически значимой корреляции между долей клеток, позитивных по каспазе-3, и другими изучаемыми параметрами; (2) не было обнаружено статистически значимой корреляции между количеством фокусов γ H2AX/53BP1 и долей покоящихся Ki-67 негативных клеток (таблица 5). Ещё более существенные изменения в корреляционной матрице наблюдались через 72 ч после облучения: (1) по-прежнему отсутствовала статистически значимая корреляция между долей клеток, позитивных по каспазе-3, и другими изучаемыми параметрами. Более того, коэффициенты снизились ещё 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 (таблица 6).

Таблица 6. Корреляционная матрица для исследуемых показателей в фибробластах дермы кожи человека через 24, 48 и 72 ч после воздействия рентгеновского излучения.

	γ H2AX	53BP1	pATM	p-p53	каспаза-3	LC3-II	СА- β -гал	Ki-67
24 ч								
γ H2AX	-	0.998 *	0.998 *	0.983 *	0.877	0.952 *	0.939 *	0.928 *
53BP1	0.998 *	-	0.999 *	0.977 *	0.853	0.950 *	0.926 *	0.913 *
pATM	0.998 *	0.999 *	-	0.978 *	0.872	0.963 *	0.941 *	0.929 *
p-p53	0.983 *	0.977 *	0.978 *	-	0.889 *	0.944 *	0.920 *	0.914 *
каспаза-3	0.877	0.853	0.872	0.889 *	-	0.934 *	0.976 *	0.984 *
LC3-II	0.952 *	0.950 *	0.963 *	0.944 *	0.934 *	-	0.974 *	0.972 *
СА- β -гал	0.939 *	0.926 *	0.941 *	0.920 *	0.976 *	0.974 *	-	0.999 *
Ki-67	0.928 *	0.913 *	0.929 *	0.914 *	0.984 *	0.972 *	0.999 *	-
48 ч								
γ H2AX	-	0.998 *	0.996 *	0.970 *	0.218	0.938 *	0.916 *	0.851
53BP1	0.998 *	-	0.991 *	0.956 *	0.200	0.923 *	0.909 *	0.837
pATM	0.996 *	0.991 *	-	0.984 *	0.286	0.964 *	0.940 *	0.889 *
p-p53	0.970 *	0.956 *	0.984 *	-	0.312	0.972 *	0.932 *	0.901 *
каспаза-3	0.218	0.200	0.286	0.312	-	0.513	0.569	0.682
LC3-II	0.938 *	0.923 *	0.964 *	0.972 *	0.513	-	0.976 *	0.970 *
СА- β -гал	0.916 *	0.909 *	0.940 *	0.932 *	0.569	0.976 *	-	0.984 *
Ki-67	0.851	0.837	0.889 *	0.901 *	0.682	0.970 *	0.984 *	-
72 ч								
γ H2AX	-	0.997 *	0.994 *	0.974 *	-0.143	0.970 *	0.827	0.799
53BP1	0.997 *	-	0.990 *	0.979 *	-0.150	0.965 *	0.835	0.790
pATM	0.994 *	0.990 *	-	0.988 *	-0.063	0.981 *	0.866	0.854
p-p53	0.974 *	0.979 *	0.988 *	-	-0.036	0.966 *	0.895 *	0.864
каспаза-3	-0.143	-0.150	-0.063	-0.036	-	0.102	0.397	0.449
LC3-II	0.970 *	0.965 *	0.981 *	0.966 *	0.102	-	0.926 *	0.908 *
СА- β -гал	0.827	0.835	0.866	0.895 *	0.397	0.926 *	-	0.962 *
Ki-67	0.799	0.790	0.854	0.864	0.449	0.908 *	0.962 *	-

*корреляции значимы при $p < 0.05$.

Чтобы понять общую картину взаимосвязи между изменениями изучаемых показателей, показалось интересным провести кластерный анализ с построением иерархического кластерного дерева (рис. 23). Было показано, что наиболее сходными являются изменения в количестве фокусов белков DRR со следующей иерархией в порядке увеличения расстояния: (1) фокусы pATM и p-p53(Ser-15); (2) фокусы pATM, p-p53(Ser-15) и 53BP1; (3) фокусы

pATM, p-p53(Ser-15), 53BP1 и γ H2AX; (4) фокусы белков DDR и каспаза-3; (5) фокусы белков DDR, каспаза-3 и LC3-II; (6) фокусы белков DDR, каспаза-3, LC3-II и СА- β -галактозидаза; (7) фокусы белков DDR, каспаза-3, LC3-II, СА- β -галактозидаза и Ki-67 (рис. 23). 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 поврежденных клеток по механизмам апоптоза и аутофагии, старение и остановку пролиферации.

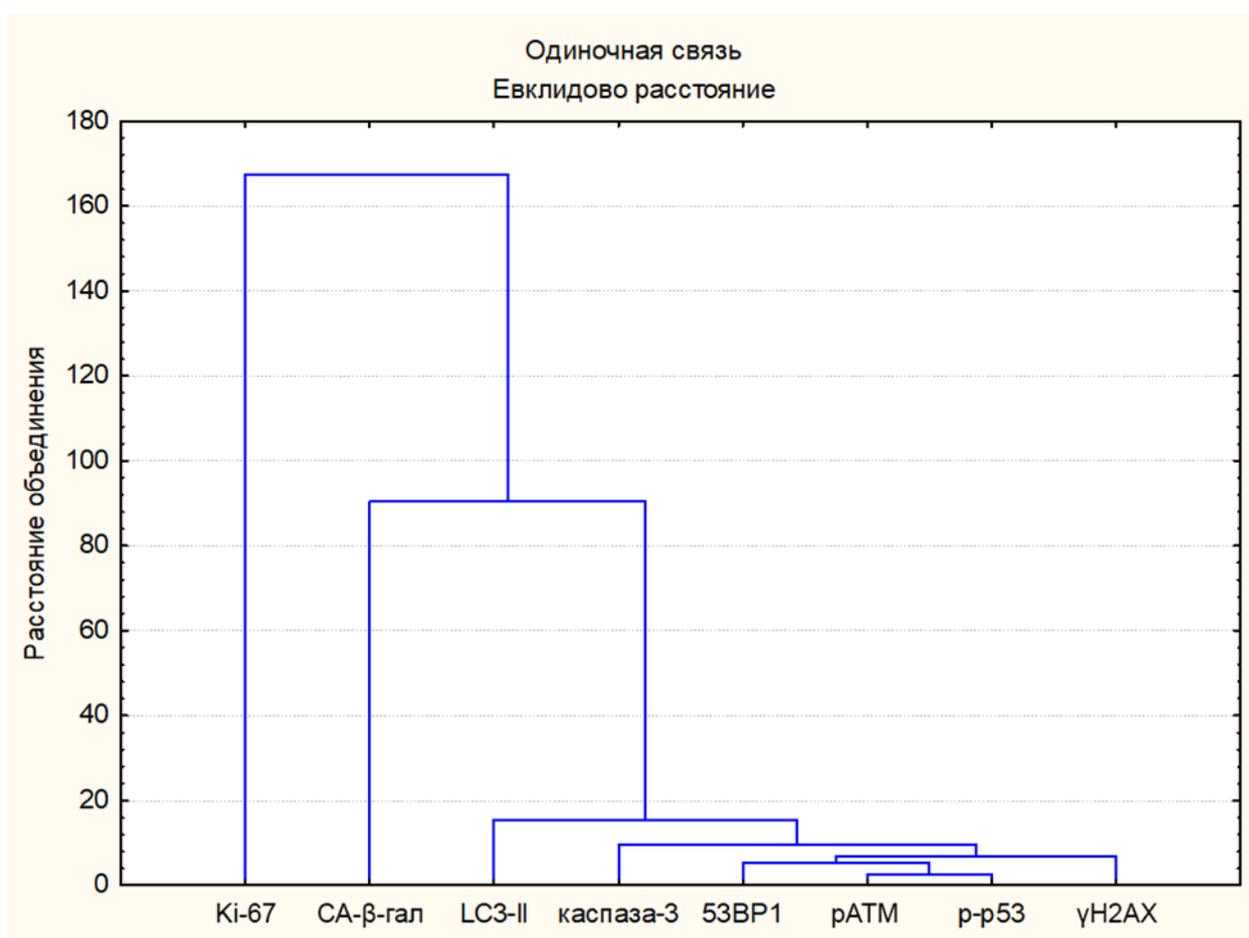


Рисунок 23. Кластерное дерево для исследуемых показателей в облучённых фибробластах человека.

3.4. Связь остаточных фокусов белков репарации ДНК с клоногенной выживаемостью

На рис. 24 представлены результаты оценки клоногенной выживаемости облучённых 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 – $0,99 \pm 0,09 \text{ Гр}$.

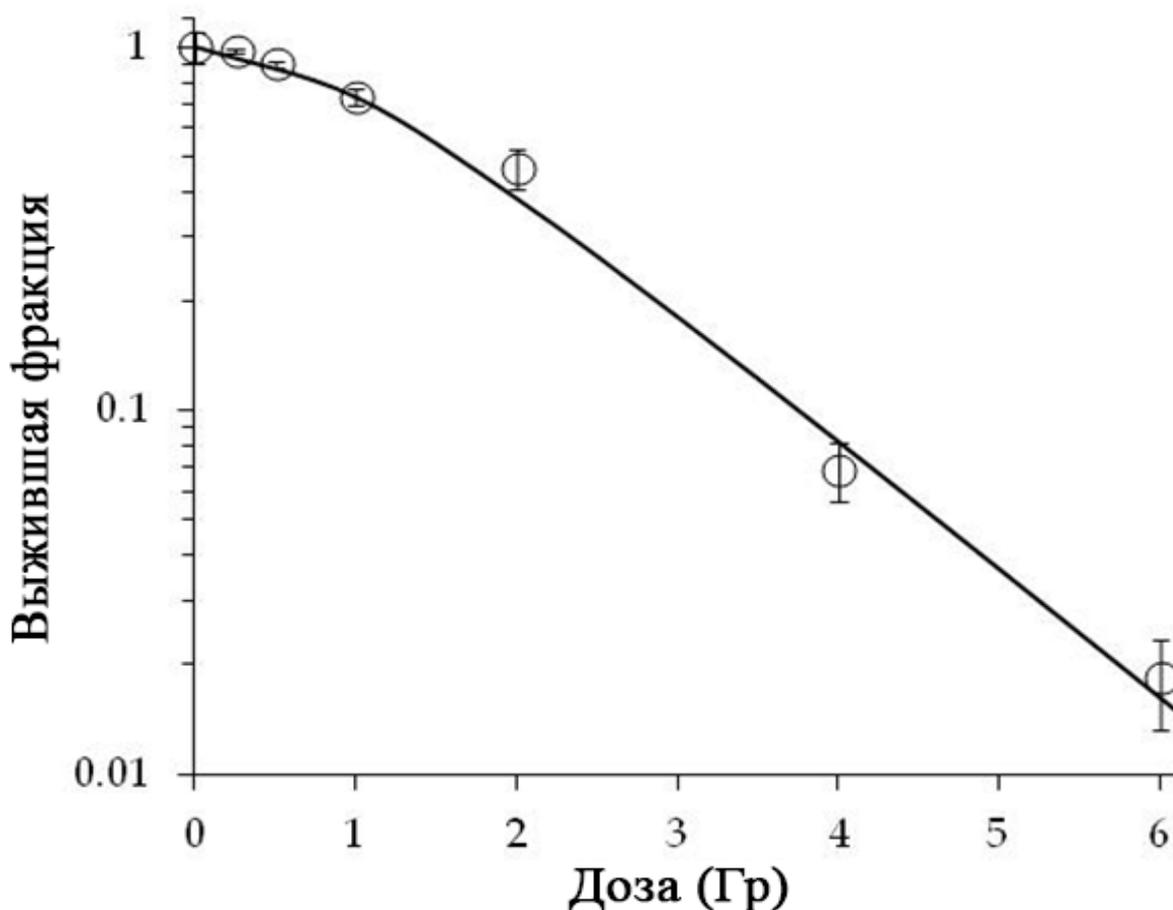


Рисунок 24. Кривая выживаемости фибробластов человека, облучённых рентгеновским излучением. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

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 облучённых 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. В результате потомки облучённых клеток могут преждевременно потерять способность к пролиферации, что тесно связано с радиационно-индуцированным клеточным старением, или онкотрансформироваться. В ходе настоящей работы была проведена оценка молекулярных и клеточных эффектов в 5, 10 и 15 пассажах после облучения в малой и больших дозах.

3.5.1. Фокусы белков репарации ДНК

Хотя подавляющее большинство повреждений ДНК, вызванных воздействием ИИ, быстро элиминируется, некоторые повреждения в очень небольших количествах сохраняются в ядре клетки или её потомков в течение длительного времени (до нескольких месяцев) [253]. Эти повреждения могут представлять значительную угрозу для организма и включают определенные типы сложных ДР ДНК. Считается, что такие повреждения вызывают стойкое нарушение функций клеток и тканей и вызывают отдаленные эффекты облучения, такие как индукция отсроченной клеточной гибели, мутации, старение или канцерогенез [253].

Результаты оценки количества фокусов γ H2AX в 5, 10 и 15 клеточных пассажах после облучения представлены на рис. 25. 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 облучённых 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 было показано, что радиационно-индуцированные фокусы γH2AX в культивируемых эндотелиальных клетках пупочной вены, облучённых рентгеновским излучением в дозе 5 Гр способны передаваться следующей клеточной генерации (проходить через митоз) [254]. Другим возможным объяснением может служить передача через пассажи популяции жизнеспособных, но потерявших способность к делению непосредственно облучённых клеток. Эти сильноповрежденные клетки с нерепарируемыми повреждениями могут поддерживать высокий уровень фокусов в тотальной популяции клеток.

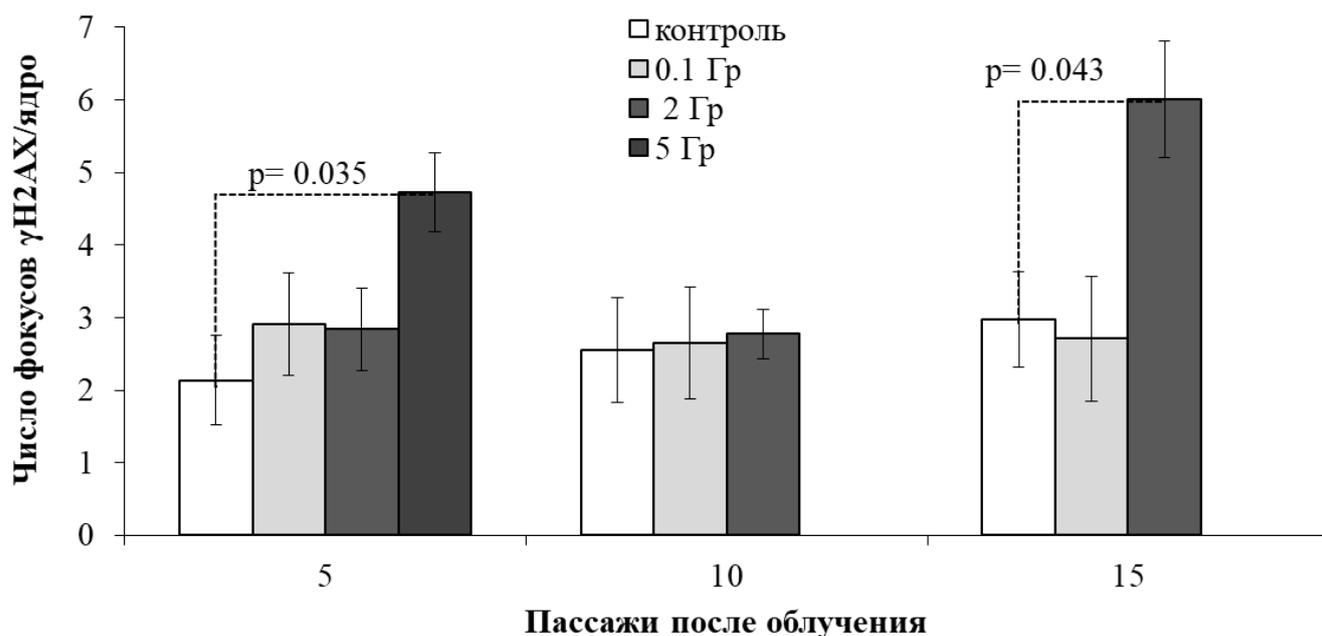


Рисунок 25. Количество фокусов γH2AX в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

Нам не удалось провести культивирование клеток облучённых в дозе 5 Гр до 10 пассажа вследствие их низкой пролиферативной активности.

Поэтому на 10 и 15 клеточных пассажах исследовались только клетки, облучённые в дозах 100 и 2000 мГр. На 10 пассаже в потомках облучённых клеток не было отмечено статистически значимого повышенного количества фокусов (рис. 25). Однако в 15 клеточном пассаже после облучения в дозе 2 Гр было зарегистрировано статистически значимое повышенное количество фокусов (рис. 25). Можно предположить, что их увеличение вызвано радиационно-индуцированным старением и/или геномной нестабильностью.

На рис. 26 представлены результаты подсчета количества фокусов 53BP1 в различных клеточных пассажах после облучения. Также 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 не отмечалось с 5 до 15 пассаж после облучения. Однако стоит отметить тенденцию к повышению количества фокусов на 15 пассаже после облучения в дозе 2 Гр.

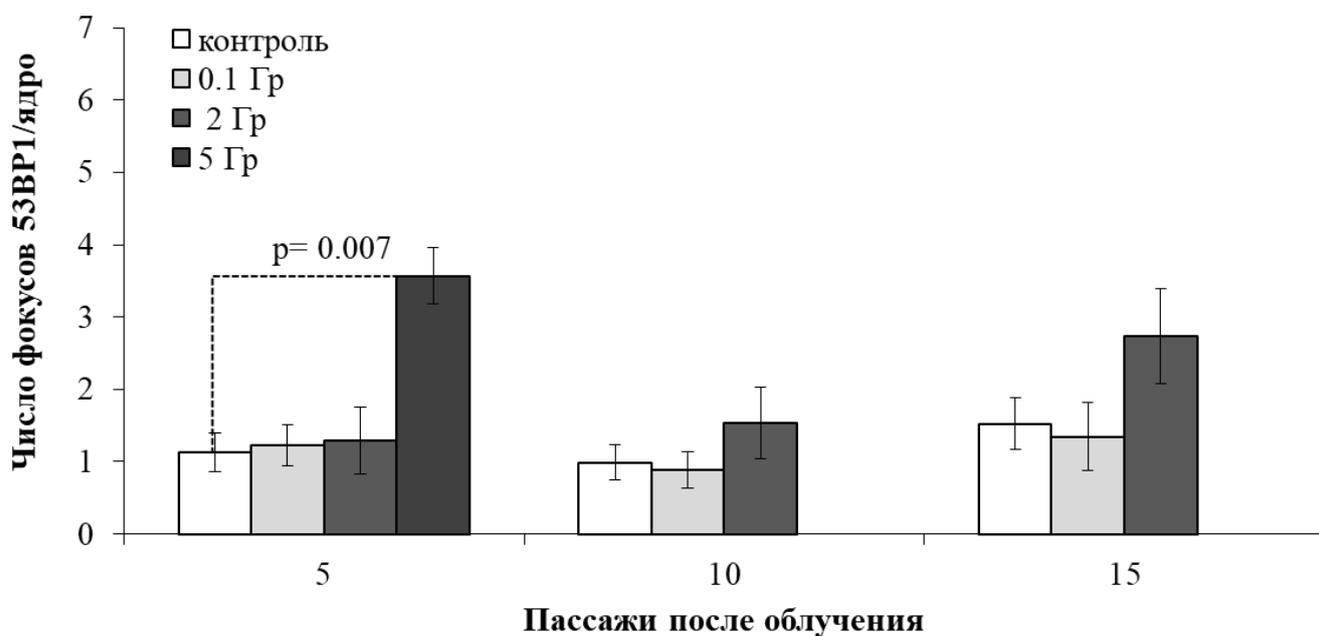


Рисунок 26. Количество фокусов 53BP1 в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

Результаты оценки количества фокусов pATM в 5, 10 и 15 клеточных пассажах после воздействия рентгеновского излучения, представленные на рис. 27, сходны с результатами оценки фокусов 53BP1. Статически значимое повышенное количество фокусов отмечалось только после облучения в дозе 5 Гр на 5 пассаже.

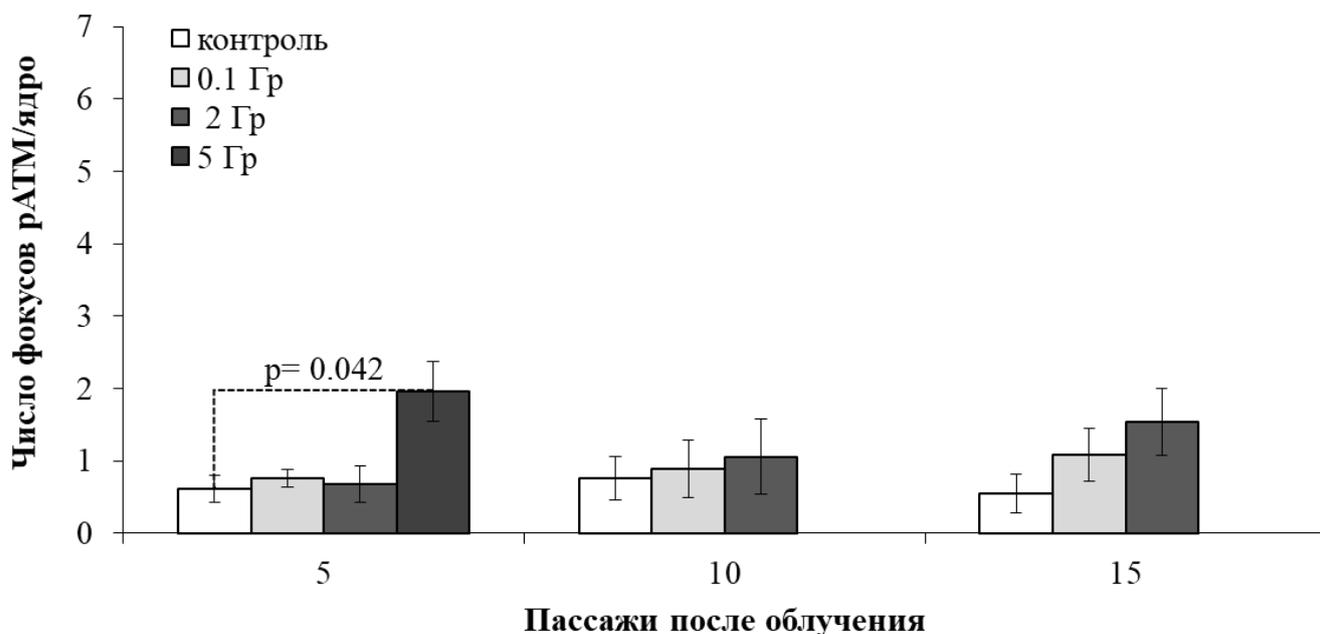


Рисунок 27. Количество фокусов rATM в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

Результаты оценки количества фокусов p-p53 (Ser-15) в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека представлены на рис. 28. В целом изменения количества фокусов p-p53(Ser-15) в клеточных пассажах сходны с результатами, полученными при анализе фокусов γ H2AX. Было отмечено статически 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. 28).

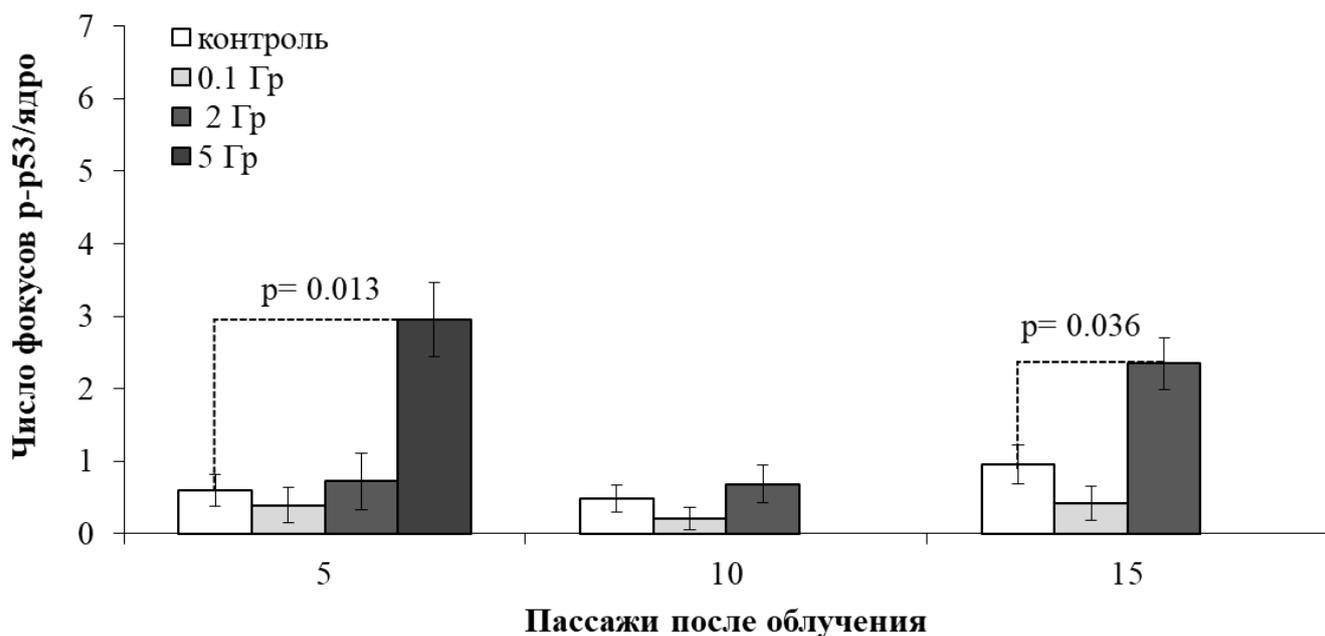


Рисунок 28. Количество фокусов p-p53(Ser-15) в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

В целом, результаты исследований свидетельствуют о том, что облучение в малой дозе (0,1 Гр) не приводит к статистически значимому увеличению количества фокусов всех изученных белков. 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 облучённых клеток через митоз, так и перепассированием непосредственно облучённых 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

На рис. 29 представлены результаты оценки доли стареющих СА-β-галактозидаза позитивных клеток в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. 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 пассажа после облучения) [255].

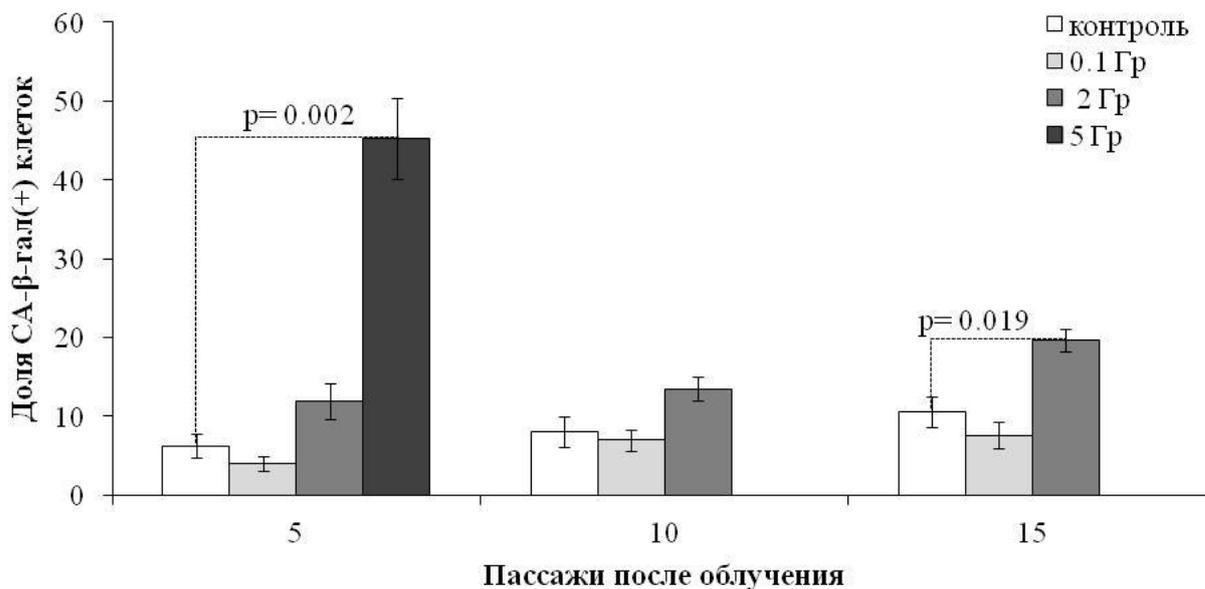


Рисунок 29. Доля СА-β-галактозидаза позитивных клеток в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов ± SE.

3.5.3. Доля Ki-67 негативных клеток

Результаты оценки доли непролиферирующих (покоящихся и стареющих) Ki-67 негативных клеток в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека представлены на рис. 30. Было показано, что статистически значимая высокая 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, облучённых в дозе 5 Гр, вынудило 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. Обращает на себя внимание, хотя и статистически незначимая, но несколько более высокая

пролиферативная активность облучённых в дозе 0,1 Гр клеток, по сравнению с соответствующим контролем.

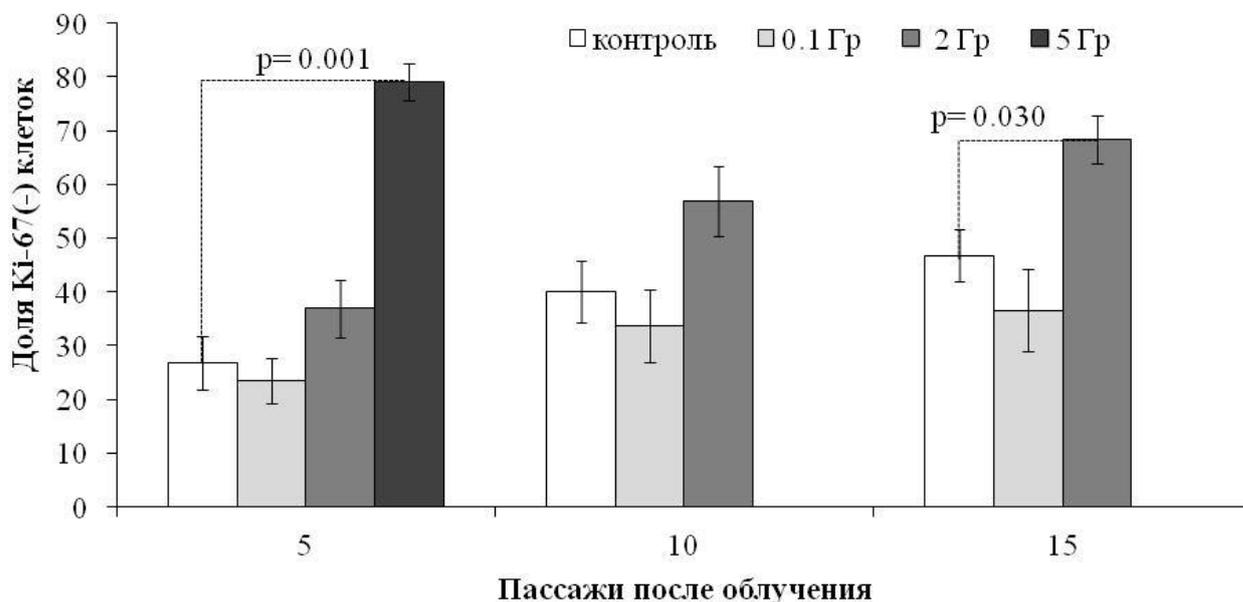


Рисунок 30. Доля Ki-67 негативных клеток в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

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. 31. 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 [256].

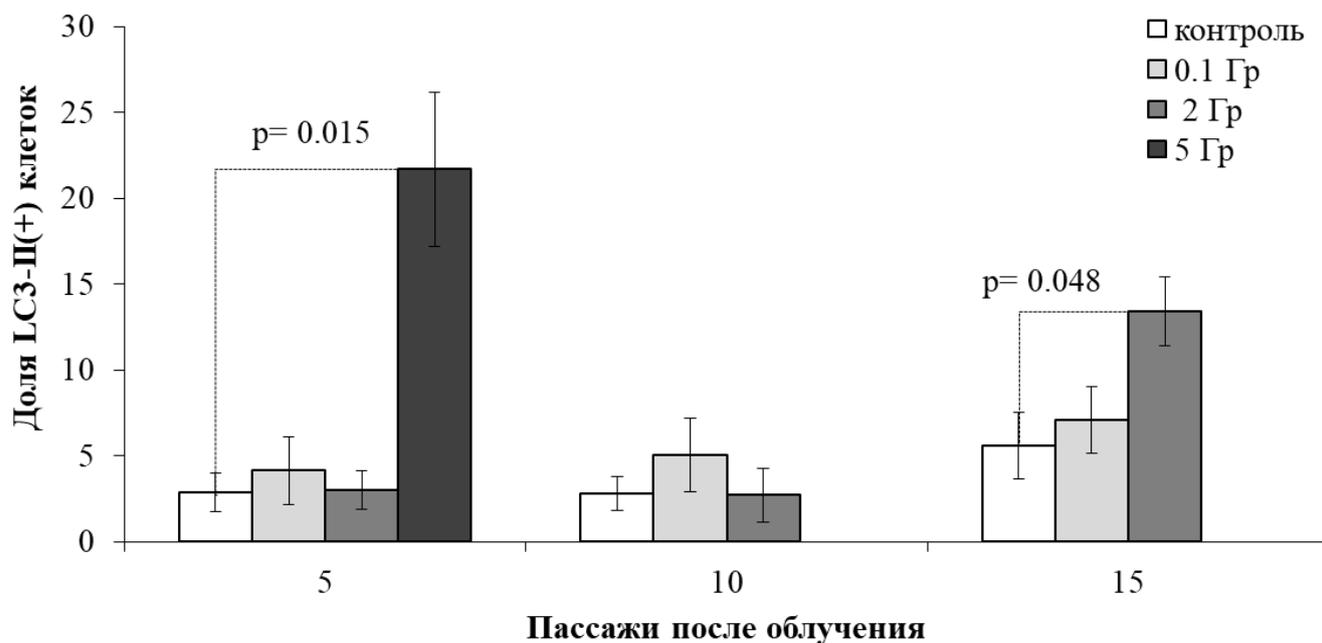


Рисунок 31. Доля LC3-II позитивных клеток в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

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. 32). По всей видимости, в потомках облучённых 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 [257].

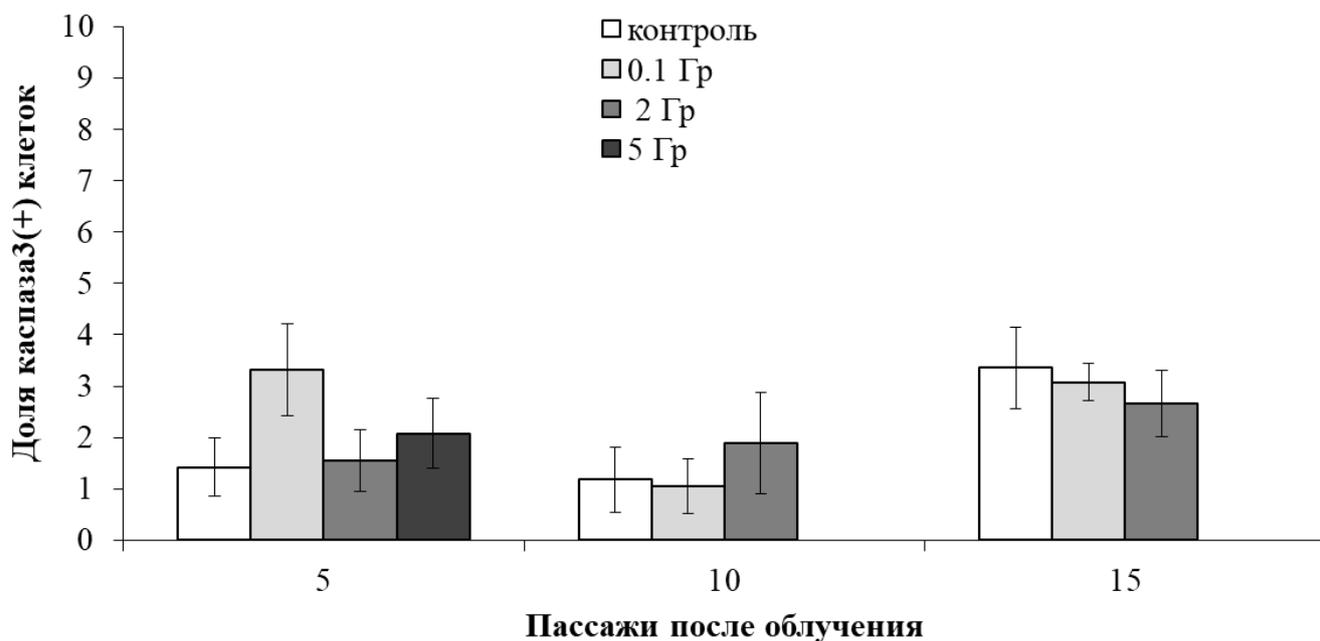


Рисунок 32. Доля каспаза-3 позитивных клеток в различных клеточных пассажах облученных и контрольных фибробластов дермы кожи человека. Результаты представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm SE.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что наибольший количественный выход наблюдается для фокусов белка γ H2AX, который является сенсорным белком, инициирующим последующее накопление и посттрансляционную модификацию сигнальных и репарационных белков [258, 259]. Связь γ H2AX с белком-медиатором MDC1 является одним из начальных этапов передачи сигналов о повреждении ДНК и репарации [260, 261]. На этом начальном этапе при содействии γ H2AX другие сигнальные и репарационные белки, такие как 53BP1 и BRCA1, накапливаются в районе ДР [261, 262]. Белок-трансдуктор ATM, аутофосфорилируемый сразу после образования ДНК (pATM), является основной киназой, фосфорилирующей гистон H2AX [263]. Также этот гистон может фосфорилироваться киназами ATR и DNA-PKcs [264, 265]. При этом киназа ATR активируется в ответ на

образование участков однострессовой ДНК, например при образовании ДР с липкими концами в результате коллапса репликативных вилок или эксцизионной репарации нуклеотидов [139]. Поэтому для оценки сайтов репарации истинных радиационно-индуцированных ДР ДНК необходимо оценивать колоколизацию фокусов γ H2AX с фокусами pATM или DNA-PKcs. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что доля колоколизированных с pATM фокусов γ H2AX зависит не только от дозы и времени после облучения, но и от пролиферативной активности клеток, меняясь в диапазоне от 50 до 80%.

Другим важным белком, участвующим в DRR, является белок-медиатор 53BP1. Хотя 53BP1 был открыт и назван на основании его взаимодействия с p53, 53BP1 наиболее тщательно охарактеризован с точки зрения его роли на концах разорванной двунитевой ДНК, где он рекрутирует эффекторные белки [266]. С-концевая область 53BP1 содержит два карбоксиконцевых (BRCT) домена BRCA1, которые взаимодействуют с p53 и γ H2AX, что важно для репарации ДР в гетерохроматине [267]. Показано, что белок 53BP1 способствует выбору репарации ДНК путём негомологичного воссоединения концов и ингибирует гомологичную рекомбинацию [268, 269]. В нашем исследовании количественный выход фокусов 53BP1 составлял ~ 70-90 % от количественного выхода фокусов γ H2AX.

Следующим изученным белком был эффекторный белок p53, фосфорилированный по серину 15. Серин 15 является основной мишенью DDR для белка p53 и фосфорилируется как протеинкиназами ATM, так и ATR [35, 270]. В отличие от p53 фосфорилированного по серину-46, который является белком-киллером и не локализуется в местах репарации ДНК, p53 фосфорилированный по серину-15 активирует арест клеточного цикла и локализуется в виде фокусов [34, 271]. ATM-опосредованное фосфорилирование p53 и CHK2 (checkpoint kinase 2) приводит к активации контрольных точек клеточного цикла, предотвращая нестабильность генома [34, 272]. Анализ количества фокусов белков репарации ДНК в ранний

период (0,5 и 4 ч) после облучения в дозах от 0,1 до 5 Гр, показал, что кривые доза-эффект для фокусов всех выбранных белков характеризуются линейным отрезком до 1 Гр, после чего выход фокусов уменьшается с увеличением дозы.

Снижение количественного выхода фокусов после облучения от 2 Гр может быть отражением биологических процессов:

1. Слиянием отдельнолежащих фокусов с образованием более крупных «центров» репарации. Существование «центров» репарации было показано в работе T. Neumaier et al. и было использовано авторами для объяснения аналогичного снижения количественного выхода фокусов с увеличением дозы облучения [273].
2. Увеличением скорости репарации ДНК в ущерб её корректности. С увеличением дозы облучения вклад быстрого механизма негомологичного воссоединения концов увеличивается [274].

Альтернативным механистическим объяснением может являться несовершенство использованной нами 2D микроскопии (в 2D проекции объемного ядра вышележащий фокус закрывает нижележащий). В результате чего при большом количестве фокусов будет происходить недооценка их числа.

Поэтому для сравнения количественного выхода фокусов различных белков мы выбрали диапазон доз до 1 Гр. В целом, в соответствии с количественным выходом фокусов через 0,5 ч после облучения, исследуемые белки могут быть расположены в порядке убывания: $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM} > \text{p-p53(Ser-15)}$. Через 4 часа после облучения количественный выход фокусов γH2AX , pATM , 53BP1 уменьшается в ~ 2 раз. Однако в случае с фокусами p-p53(Ser-15) существенного изменения количественного выхода фокусов не наблюдалось. По всей видимости, это связано с ролью этого белка в клеточном отклике на облучение (арест клеточного цикла), поэтому

кинетика изменения количества фокусов не отражает кинетику репарации ДНК.

В нашем исследовании количество остаточных фокусов γ H2AX, 53BP1, pATM и p-p53(Ser-15) оценивали через 24, 48 и 72 часа после облучения фибробластов человека в дозах от 0,1 до 10 Гр. Зависимости доза-эффект для остаточных фокусов репарации ДНК в облучённых клетках хорошо описываются линейной беспороговой моделью. В соответствии с количественным выходом остаточных фокусов, исследуемые белки могут быть расположены в порядке убывания: γ H2AX > 53BP1 > pATM \geq p-p53(Ser-15). С увеличением времени после облучения с 24 до 72 ч количество остаточных фокусов всех исследуемых белков уменьшается. Уменьшение количества остаточных фокусов может быть объяснено несколькими параллельными процессами: элиминацией сильно поврежденных клеток; завершением процесса репарации ДНК; и, наконец, снижением пролиферативной активности клеток, сопровождающимся снижением количества репликативных повреждений ДНК. Другие авторы также описывают зависимости доза-эффект для остаточных фокусов репарации ДНК в облучённых клетках с помощью линейной беспороговой модели [39, 275-277]. Однако возникают вопросы: 1) Насколько подходящей является линейная беспороговая модель для описания зависимости доза-эффект для количества остаточных фокусов репарации ДНК в облучённых клетках в широком диапазоне доз? 2) Существует ли дозовый порог для остаточных фокусов репарации ДНК? Чтобы ответить на эти вопросы, был проведен математический анализ полученных данных с использованием «hockey stick» («хоккейная клюшка») модели. Эта модель является простейшей математической пороговой моделью, позволяющей определить пороговую дозу td , за которой следует линейно-зависимое от дозы увеличение эффекта [231]. Анализ данных, выполненный с использованием «hockey stick» модели, показал наличие статистически

значимого дозового порога только для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения. Пороговая доза для фокусов γ H2AX через 48 часов после облучения составляла $0,86 \pm 0,20$ Гр, а через 72 часа $0,66 \pm 0,17$ Гр. В случае фокусов 53BP1 пороговая доза составляла $0,87 \pm 0,16$ Гр (48 ч) и $1,05 \pm 0,19$ (72 ч).

Представлялось интересным сравнить полученные пороговые дозы с квазипороговой дозой, рассчитанной по кривой клоногенной выживаемости клеток. Количественная оценка репродуктивной гибели клеток с использованием клоногенного анализа является золотым стандартом для оценки клеточных эффектов в радиобиологии [278-280]. Широко известно, что кривые выживаемости клеток млекопитающих, облучённых ИИ с низким ЛПЭ, обычно имеют «плечевую» область в диапазоне низких доз [281]. Общепринято, что «плечо» кривой выживаемости отражает восстановление клеток после сублетальных повреждений [282]. Ширина плеча определяется так называемой квазипороговой дозой (D_q), до достижения которой возможно успешное восстановление клеток [283]. В результате анализа кривой выживаемости было показано, что D_q для облучённых рентгеновским излучением фибробластов составляет $0,99 \pm 0,09$ Гр. Полученное значение хорошо согласуется с литературными данными. В частности было показано, что D_q для фибробластов человека, облучённых рентгеновским излучением, колеблется в диапазоне от 0,57 до 1,15 Гр [284]. Таким образом, нами были впервые определены не только пороговые дозы для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения клеток, но и доказано, что они близки к полученной на тех же клетках квазипороговой дозе D_q . Хорошее соответствие между рассчитанными значениями пороговой дозы для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 и D_q в облучённых фибробластах доказывает, что остаточные фокусы – это регионы хроматина, где клетки всё ещё пытаются восстановить летальные повреждения ДНК.

Рентгеновское излучение также приводило к дозозависимому увеличению доли каспаза-3, LC3-II и СА- β -гал позитивных и Ki-67 негативных фибробластов через 24 ч после облучения в дозах 1-10 Гр. К 72 ч после облучения доля гибнущих (каспаза-3 и LC3-II) позитивных клеток уменьшается, в то время как доля стареющих клеток, наоборот, увеличивается. В ответ на образование ДР ДНК клетки активируют точки контроля клеточного цикла через сигнальный путь ATM/ATR главным образом через p53, CHK1 и CHK2 при участии p21, p16 и Rb [285]. Интересно, что наибольшая доля клеток, позитивных по каспазе-3, была отмечена через 24 ч после облучения, а доля клеток, позитивных по LC3-II, – через 48 ч. То есть уменьшение количества клеток, позитивных по каспазе-3, сопровождается увеличением доли клеток, позитивных по LC3-II. Через 48 и 72 ч после воздействия рентгеновского излучения доля каспаза-3 позитивных клеток статистически значимо не коррелировала ни с одним из изученных параметров. На рис. 33 представлен 3D график взаимосвязи между изменениями фракций СА- β -гал, каспаза-3 и LC3-II позитивных фибробластов. Примечательно, что старение и аутофагия действуют как партнеры, усиливая друг друга в противовес активности каспазы-3.

Известно, что аутофагия и апоптоз перекрестно регулируют друг друга посредством сложной сети взаимосвязей, которая также включает взаимодействия между белками, связанными с аутофагией, и каспазами [250]. Показанное нами снижение активности каспазы-3, которая участвует в расщеплении различных белков, связанных с аутофагией (Atgs) [286], через 48 ч после облучения, по-видимому, способствует процессу аутофагии. Интересно, что репликативно стареющие фибробласты устойчивы к апоптотической гибели [257]. Недавние исследования показали, что аутофагия может способствовать клеточному старению, облегчая синтез секреторных белков, связанных со старением [287]. Аутофагия активируется

во время старения, и её активация коррелирует с отрицательной обратной связью в пути PI3K-мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) [288].

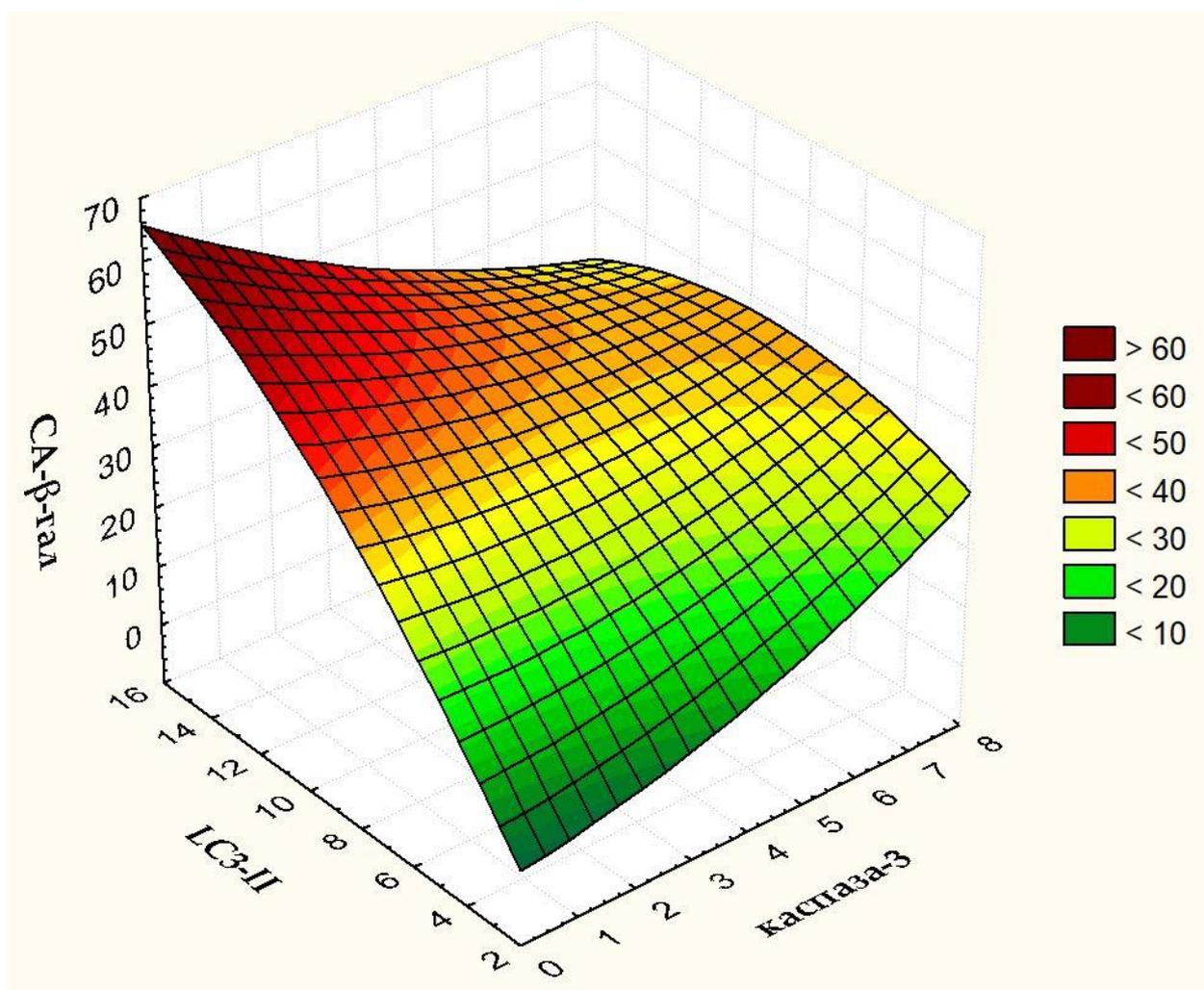


Рисунок 33. Трехмерный график взаимосвязи между изменениями фракций СА-β-галактозидаза, каспаза-3 и LC3-II позитивных фибробластов.

В нашей работе доля аутофагических клеток коррелировала с долей стареющих клеток вплоть до 72 ч после облучения. Гибель клеток, как и старение, являются механизмами защиты нормальных клеток от онкотрансформации [289, 290]. В первом случае уничтожаются сильно поврежденные, потенциально опасные клетки, а во втором они теряют способность к делению. Здесь возникают естественные вопросы. Почему бы не уничтожить все сильно поврежденные клетки? В конце концов, стареющие

клетки выделяют фенотипические факторы, связанные со старением, которые могут усиливать клеточное старение, изменять микроокружение и даже провоцировать онкогенез [291, 292]. Есть ли какой-либо биологический смысл в поддержании жизнеспособности стареющих клеток? В последнее время, напротив, начали появляться доказательства того, что использование сенолитиков (веществ, удаляющих стареющие клетки) или сеностатиков (веществ, ингибирующих паракринную передачу сигналов стареющими клетками) может уменьшить повреждение нормальных тканей [291]. Однако вопрос остается открытым и требует тщательного изучения.

Интересные результаты были получены при исследовании отдаленных эффектов в потомках клеток, облучённых в больших дозах (2 и 5 Гр). В клеточных популяциях 5 пассажа после облучения в дозе 5 Гр наблюдалось повышенное количество фокусов белков репарации ДНК, пониженная пролиферативная активность и высокая доля стареющих и аутофагических клеток. При этом количество фокусов было близко к их количеству на 72 ч после облучения в этой же дозе. Сразу возникает вопрос, каков механизм столь длительного поддержания повышенного количества фокусов? Ранее сообщалось, что в популяциях эндотелиальных клетках пупочной вены человека облучённых тормозными фотонами в дозе 5 Гр повышенное количество остаточных фокусов γ H2AX поддерживается как минимум 7 суток после облучения (окончание срока наблюдения) [254]. Авторы предположили, что столь длительное поддержания повышенного количества остаточных фокусов γ H2AX объясняется их передачей через митоз. Альтернативно можно объяснить этот эффект тем, что высокоповрежденные, потерявшие способность к делению клетки не гибнут, а напротив могут быть долгоживущими и сохраняться в клеточных популяциях длительное время после облучения. В любом случае, точный механизм феномена длительного поддержания повышенного количества остаточных фокусов белков репарации ДНК требует отдельного тщательного изучения. После облучения

в дозе 2 Гр на 5 и 10 клеточных пассажах не наблюдалось негативных эффектов по исследованным показателям. Однако на 15 клеточном пассаже после облучения было обнаружено повышенное количество фокусов γ H2AX и p-p53 (Ser-15), а также увеличение доли стареющих и аутофагических клеток. Увеличение количества фокусов γ H2AX является одним из характерных маркеров стареющих клеток [293]. Воздействие рентгеновского излучения в больших дозах вызывает укорачивание длины теломер в облучённых фибробластах [294]. При длительном пассировании облучённых клеток это может проявляться в виде снижения лимита Хейфлика. Как уже отмечалось увеличение доли стареющих клеток на 15 пассаже после облучения в дозе 2 Гр увеличение доли стареющих клеток сопровождается увеличением доли аутофагических клеток. Аутофагия и старение имеют ряд общих характеристик, что позволяет предположить, что эти процессы могут служить для совместной защиты клетки как от внешних стресс-факторов, таких как ионизирующее излучение и химические агенты, так и от внутренних форм стресса, таких как укорочение теломер и активация онкогена. Исследования активации онкогенов в нормальных фибробластах, показали, что аутофагия и старение тесно связаны, но не обязательно взаимозависимы [295]. В частности, ингибирование аутофагии задерживает, но не отменяет клеточное старение [295]. Также не исключено, что эти процессы ассоциированы с радиационно-индуцированной нестабильностью генома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе впервые было проведено одновременное исследование зависимостей доза-эффект и пострадиационных изменений количества фокусов белков, представляющих все основные функциональные классы белков DDR (сенсоры, трансдукторы, медиаторы и эффекторы), в фибробластах дермы кожи человека, облучённых рентгеновским излучением.

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». В целом, в соответствии с количественным выходом фокусов через 0,5 ч после облучения, исследуемые белки могут быть расположены в порядке убывания: $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM} > \text{p-p53(Ser-15)}$. Через 4 часа после облучения количественный выход фокусов γH2AX , pATM , 53BP1 уменьшается в ~ 2 раз. Однако в случае с фокусами p-p53(Ser-15) существенного изменения количественного выхода фокусов через 4 ч после облучения не наблюдалось. По всей видимости, это связано с ролью этого белка в клеточном отклике на облучение (арест клеточного цикла), поэтому кинетика изменения количества фокусов не отражает кинетику репарации ДНК.

Зависимости доза-эффект для остаточных фокусов белков репарации ДНК через 24-72 ч после облучения клеток в дозах 0,1 – 10 Гр хорошо фиттируются линейной беспороговой моделью. В соответствии с количественным выходом остаточных фокусов, исследуемые белки могут быть расположены в порядке убывания: $\gamma\text{H2AX} > 53\text{BP1} > \text{pATM} \geq \text{p-p53(Ser-15)}$. С увеличением времени после облучения с 24 до 72 ч количество остаточных фокусов всех исследуемых белков уменьшается. Уменьшение количества остаточных фокусов может быть объяснено несколькими параллельными процессами: элиминацией сильно

поврежденных клеток; завершением процесса репарации ДНК; и, наконец, снижением пролиферативной активности клеток, сопровождающимся снижением количества репликативных повреждений ДНК.

Анализ дозовых зависимостей, выполненный с использованием «hockey stick» модели, впервые показал наличие статистически значимого дозового порога для остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 48 и 72 ч после облучения. Не было показано статистически значимого дозового порога для остаточных фокусов pATM и p-p53. Пороговая доза для фокусов γ H2AX через 48 часов после облучения составляла $0,86 \pm 0,20$ Гр, а через 72 часа $0,66 \pm 0,17$ Гр. В случае 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 облучённых фибробластов ($D_q = 0,99 \pm 0,09$ Гр).

Впервые выполнен анализ взаимосвязи между остаточными фокусами белков репарации ДНК, пролиферативной активностью, а также долей β -галактозидаза позитивных, каспаза-3 позитивных и аутофагических клеток в популяциях облучённых фибробластов через 24-72 ч после воздействия рентгеновского излучения. 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.

Обнаружен феномен дозового порога для формирования отдаленных молекулярных и клеточных эффектов облучения в больших дозах. Впервые показано, что после облучения в дозе 5 Гр при пассировании клеток наблюдалось стойкое сохранение повышенного количества фокусов белков репарации ДНК, сопровождающееся низкой пролиферативной активностью и высокой долей β -галактозидаза позитивных и аутофагических клеток. Тогда как после облучения в дозе 2 Гр отдаленные негативные эффекты облучения,

ассоциирование с клеточным старением, были обнаружены только на 15 пассаже после облучения. Здесь необходимо отметить, что в исследовании использовалось 6 маркеров клеточного старения, относящихся к 4-м характеристическим признакам, ассоциированным с клеточным старением:

- 1) лизосомальная активность (СА- β -галактозидаза);
- 2) накопление нерепарируемых повреждений ДНК (фокусы γ H2AX, 53BP1 и ATM);
- 3) снижение пролиферативной активности (Ki-67 негативные клетки);
- 4) активация p53 (фокусы p-p53(Ser-15)).

Одной из важных задач настоящей работы было оценка отдаленных эффектов в популяциях фибробластов, облучённых рентгеновским излучением в малой дозе. Известны случаи отказа пациентов от проведения диагностических рентгенологических исследований из-за радиофобии. Поэтому такие исследования являются не только научно, но и социально значимыми. 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.

В заключение необходимо подчеркнуть, что 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.

ВЫВОДЫ

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 облучённых 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

Гр – Грей

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДР ДНК – двунитевой разрыв ДНК

ИИ – ионизирующее излучение

ЛПЭ – линейная передача энергии

ЛТ – лучевая терапия

ММП – матриксные металлопротеиназы

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

53BP1 (англ. p53 binding protein) – p53-связывающий белок

α SMA (англ. α -smooth muscle actin) – альфа-актин гладких мышц

A-EJ (англ. Alternative end-joining) – альтернативное соединение концов

АТМ (англ. Ataxia telangiectasia mutated) – серин/треониновая протеинкиназа, мутация по которой вызывает заболевание – атаксия телеангиэктазия

ATR (англ. Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) – АТМ- и Rad3-родственная киназа

Bcl2 (англ. Apoptosis regulator Bcl-2) – внутриклеточный белковый фактор, регулирующий апоптоз

BM1 – белок, регулирующий структуру хроматина

BRCA1 (англ. Breast cancer type 1 susceptibility protein) – белок восприимчивости к раку молочной железы 1 типа

BSA (англ. Bovine serum albumin) – Бычий сывороточный альбумин

Cdc25 – фосфатаза двойной специфичности, белки которой контролируют вход и прохождение различных фаз клеточного цикла

CDK (Cyclin-dependent kinase) – циклинзависимая киназа

Chk1 (англ. Checkpoint kinase 1) – серин/треонин-специфическая протеинкиназа, которая координирует DDR и реакцию контрольной точки клеточного цикла

Chk2 (англ. Checkpoint kinase 2) – ген-супрессор опухоли, который участвует в репарации ДНК, остановке клеточного цикла или апоптозе в ответ на повреждение ДНК.

Class III PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа III класса/PtdIns3K) – главный регулятор эндоцитоза, сортировки эндосом и аутофагии

DDR (англ. DNA damage response) – реакция на повреждение ДНК

DMEM (англ. Dulbecco's modified Eagle medium) – питательная среда Игла в модификации Дюльбекко

DNA-ПК (англ. DNA-dependent protein kinase) – ДНК-зависимая протеинкиназа

ECM (англ. Extracellular matrix) – внеклеточный матрикс

ER (англ. Endoplasmic reticulum) – эндоплазматический ретикулум

ETS (англ. E26 transformation-specific) – фактор транскрипции, который способен индуцировать экспрессию p16

HR (англ. Homologous recombination) – гомологичная рекомбинация

IL-1 β (англ. Interleukin 1 beta) – Интерлейкин 1, бета

IRIF (англ. ionizing radiation induced foci) – фокусы, индуцированные ионизирующим излучением

LC3 (англ. Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3) – микротубулин-связанный белок легкой цепи 3

MDC1 (англ. Mediator of damage-checkpoint 1) – медиатор контрольной точки повреждения ДНК 1

MDM2 (англ. Mouse double minute 2 homolog) – важный негативный регулятор супрессора опухоли p53

MMEJ (англ. Microhomology-mediated end joining) – микрогомологически опосредованное соединение концов

MOMP (англ. Mitochondrial outer membrane permeabilization) – пермеабилзация внешней мембраны митохондрий

MRN (multiprotein) complex – белковый комплекс, состоящий из белков MRE11, Rad50 и Nbs1

NHEJ (англ. non-homologous end joining) – негомологичное соединение концов

OIS (англ. oncogene-induced senescence) – старение, индуцированное онкогенами

pATM (англ. Phospho-ATM) – киназа ATM, фосфорилированная по серину 1981

PBS (англ. Phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

PDGF (англ. Platelet-derived growth factor) – Тромбоцитарный фактор роста

PIKK (англ. Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases) – надсемейство фосфатидилинозитоло 3-киназосвязанных киназ

PML (англ. Promyelocytic leukemia protein) – белок промиелоцитарного лейкоза

Rad51 – Ключевой белок HR, продукт гена RAD51

SAHF (англ. Senescence-associated heterochromatin foci) – ассоциированные со старением фокусы гетерохроматина

SASP (англ. Senescence-associated secretory phenotype) – ассоциированный со старением секреторный фенотип

SSA (англ. Single-strand annealing) – однонитевой отжиг

SA- β -Gal (англ. Senescence-associated beta-galactosidase) – ассоциированная со старением бета-галактозидаза

ssDNA (англ. Single-strand DNA) – однонитевая ДНК

Ser15 (англ. Serine 15) – Серин 15

TGF- β (англ. Transforming growth factor beta) – трансформирующий фактор роста, бета

TIS (англ. therapy-induced senescence) – старение, индуцированное терапией

TNF α (англ. Tumor Necrosis Factor-alpha) – фактор некроза опухоли, альфа

TopBP1 (англ. DNA topoisomerase 2-binding protein) – белок, связывающий топоизомеразу 1

γ H2AX (англ. gamma-H2AX) – фосфорилированная форма корового гистона H2AX

UVA (англ. Ultraviolet A) – Ультрафиолет А, длинноволновой диапазон

V(D)J (англ. Variable-diversity-joining rearrangement) recombination – механизм соматической рекомбинации ДНК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Babayan N. Laser-Driven Ultrashort Pulsed Electron Beam Radiation at Doses of 0.5 and 1.0 Gy Induces Apoptosis in Human Fibroblasts. / N. Babayan, B. Grigoryan, L. Khondkaryan, G. Tadevosyan, N. Sarkisyan, R. Grigoryan et al. // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – № 20. doi: 10.3390/ijms20205140
2. Aliper A.M. Replicative and radiation-induced aging: a comparison of gene expression profiles. / A.M. Aliper, M.E. Bozdoganyan, P.S. Orekhov, A. Zhavoronkov, A.N. Osipov. // *Aging (Albany NY).* – 2019. – V. 11. – № 8. – P. 2378-2387. doi: 10.18632/aging.101921
3. Straub J.M. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. / J.M. Straub, J. New, C.D. Hamilton, C. Lominska, Y. Shnayder, S.M. Thomas. // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2015. – V. 141. – № 11. – P. 1985-94. doi: 10.1007/s00432-015-1974-6
4. Luo M. Mitigation of radiation-induced pulmonary fibrosis by small-molecule dye IR-780. / M. Luo, L. Chen, J. Zheng, Q. Wang, Y. Huang, F. Liao et al. // *Free Radic Biol Med.* – 2021. – V. 164. – P. 417-428. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.435
5. Rodel F. Basics of Radiation Biology When Treating Hyperproliferative Benign Diseases. / F. Rodel, C. Fournier, J. Wiedemann, F. Merz, U.S. Gaipl, B. Frey et al. // *Front Immunol.* – 2017. – V. 8. – P. 519. doi: 10.3389/fimmu.2017.00519
6. Kosmacek E.A. Adipocytes protect fibroblasts from radiation-induced damage by adiponectin secretion. / E.A. Kosmacek, R.E. Oberley-Deegan. // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 12616. doi: 10.1038/s41598-020-69352-w
7. Nickoloff J.A. Roles of homologous recombination in response to ionizing radiation-induced DNA damage. / J.A. Nickoloff, N. Sharma, C.P. Allen, L. Taylor, S.J. Allen, A.S. Jaiswal et al. // *Int J Radiat Biol.* – 2023. – V. 99. – № 6. – P. 903-914. doi: 10.1080/09553002.2021.1956001
8. Shibata A. A historical reflection on our understanding of radiation-induced DNA double strand break repair in somatic mammalian cells; interfacing the past

- with the present. / A. Shibata, P. Jeggo. // *Int J Radiat Biol.* – 2019. – V. 95. – № 7. – P. 945-956. doi: 10.1080/09553002.2018.1564083
9. Mladenov E. New Facets of DNA Double Strand Break Repair: Radiation Dose as Key Determinant of HR versus c-NHEJ Engagement. / E. Mladenov, V. Mladenova, M. Stuschke, G. Iliakis. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2023. – V. 24. – № 19. doi: 10.3390/ijms241914956
10. Krenning L. Life or Death after a Break: What Determines the Choice? / L. Krenning, J. van den Berg, R.H. Medema. // *Mol Cell.* – 2019. – V. 76. – № 2. – P. 346-358. doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.023
11. Torgovnick A. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. / A. Torgovnick, B. Schumacher. // *Front Genet.* – 2015. – V. 6. – P. 157. doi: 10.3389/fgene.2015.00157
12. Shibata A. DNA double-strand break repair in a cellular context. / A. Shibata, P.A. Jeggo. // *Clin Oncol (R Coll Radiol).* – 2014. – V. 26. – № 5. – P. 243-9. doi: 10.1016/j.clon.2014.02.004
13. Oh J.M. Crosstalk between different DNA repair pathways for DNA double strand break repairs. / J.M. Oh, K. Myung. // *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* – 2022. – V. 873. – P. 503438. doi: 10.1016/j.mrgentox.2021.503438
14. White R.R. Do DNA Double-Strand Breaks Drive Aging? / R.R. White, J. Vijg. // *Mol Cell.* – 2016. – V. 63. – № 5. – P. 729-38. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.004
15. Jiang Y. Contribution of Microhomology to Genome Instability: Connection between DNA Repair and Replication Stress. / Y. Jiang. // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23. – № 21. doi: 10.3390/ijms232112937
16. Sishc B.J. The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. / B.J. Sishc, A.J. Davis. // *Cancers (Basel).* – 2017. – V. 9. – № 7. doi: 10.3390/cancers9070081
17. Bushmanov A. Utilization of DNA double-strand breaks for biodosimetry of ionizing radiation exposure. / A. Bushmanov, N. Vorobyeva, D. Molodtsova, A.N. Osipov. // *Environmental Advances.* – 2022. – V. 8. doi: 10.1016/j.envadv.2022.100207

18. Barbieri S. Predicting DNA damage foci and their experimental readout with 2D microscopy: a unified approach applied to photon and neutron exposures. / S. Barbieri, G. Babini, J. Morini, W. Friedland, M. Buonanno, V. Grilj et al. // *Sci Rep.* – 2019. – V. 9. – № 1. – P. 14019. doi: 10.1038/s41598-019-50408-5
19. Rothkamm K. DNA damage foci: Meaning and significance. / K. Rothkamm, S. Barnard, J. Moquet, M. Ellender, Z. Rana, S. Burdak-Rothkamm. // *Environ Mol Mutagen.* – 2015. – V. 56. – № 6. – P. 491-504. doi: 10.1002/em.21944
20. Penninckx S. Quantification of radiation-induced DNA double strand break repair foci to evaluate and predict biological responses to ionizing radiation. / S. Penninckx, E. Pariset, E. Cekanaviciute, S.V. Costes. // *NAR Cancer.* – 2021. – V. 3. – № 4. – P. zcab046. doi: 10.1093/narcan/zcab046
21. Belyaev I.Y. Radiation-induced DNA repair foci: spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry. / I.Y. Belyaev. // *Mutat Res.* – 2010. – V. 704. – № 1-3. – P. 132-41. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.011
22. Wanotayan R. A deep learning model (FociRad) for automated detection of gamma-H2AX foci and radiation dose estimation. / R. Wanotayan, K. Chousangsunthorn, P. Petisiwaveth, T. Anuttra, W. Lertchanyaphan, T. Jaikuna et al. // *Sci Rep.* – 2022. – V. 12. – № 1. – P. 5527. doi: 10.1038/s41598-022-09180-2
23. Raavi V. Potential application of gamma-H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. / V. Raavi, V. Perumal, F.D.P. S. // *Mutat Res Rev Mutat Res.* – 2021. – V. 787. – P. 108350. doi: 10.1016/j.mrrev.2020.108350
24. Jakl L. Biodosimetry of Low Dose Ionizing Radiation Using DNA Repair Foci in Human Lymphocytes. / L. Jakl, E. Markova, L. Kolarikova, I. Belyaev. // *Genes (Basel).* – 2020. – V. 11. – № 1. doi: 10.3390/genes11010058
25. Falaschi A. Dual Immunofluorescence of gammaH2AX and 53BP1 in Human Peripheral Lymphocytes. / A. Falaschi, A. Chiaramonte, S. Testi, R. Scarpato. // *J Vis Exp.* – 2023.10.3791/65472 – № 197. doi: 10.3791/65472
26. Kocher S. Fully automated counting of DNA damage foci in tumor cell culture: A matter of cell separation. / S. Kocher, J. Volquardsen, A. Perugachi Heinsohn, C.

- Petersen, D. Roggenbuck, K. Rothkamm et al. // DNA Repair (Amst). – 2021. – V. 102. – P. 103100. doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103100
27. Slonina D. Low-Dose Hypersensitive Response for Residual pATM and gammaH2AX Foci in Normal Fibroblasts of Cancer Patients. / D. Slonina, A. Kowalczyk, A. Janecka-Widla, D. Kabat, W. Szatkowski, B. Biesaga. // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 2018. – V. 100. – № 3. – P. 756-766. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.10.054
28. Ulyanenko S. Formation of γ H2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation. / S. Ulyanenko, M. Pustovalova, S. Koryakin, E. Beketov, A. Lychagin, L. Ulyanenko et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20. – № 11. doi: 10.3390/ijms20112645
29. Valente D. Factors to Consider for the Correct Use of gammaH2AX in the Evaluation of DNA Double-Strand Breaks Damage Caused by Ionizing Radiation. / D. Valente, M.P. Gentileschi, A. Guerrisi, V. Bruzzaniti, A. Morrone, S. Soddu et al. // Cancers (Basel). – 2022. – V. 14. – № 24. doi: 10.3390/cancers14246204
30. Rass E. 53BP1: Keeping It under Control, Even at a Distance from DNA Damage. / E. Rass, S. Willaume, P. Bertrand. // Genes (Basel). – 2022. – V. 13. – № 12. doi: 10.3390/genes13122390
31. Lei T. Multifaceted regulation and functions of 53BP1 in NHEJ-mediated DSB repair (Review). / T. Lei, S. Du, Z. Peng, L. Chen. // Int J Mol Med. – 2022. – V. 50. – № 1. doi: 10.3892/ijmm.2022.5145
32. Bartova E. A role of the 53BP1 protein in genome protection: structural and functional characteristics of 53BP1-dependent DNA repair. / E. Bartova, S. Legartova, M. Dundr, J. Suchankova. // Aging (Albany NY). – 2019. – V. 11. – № 8. – P. 2488-2511. doi: 10.18632/aging.101917
33. Shibata A. ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. / A. Shibata, P.A. Jeggo. // Genes (Basel). – 2021. – V. 12. – № 9. doi: 10.3390/genes12091370

34. Al Rashid S.T. Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks in vivo. / S.T. Al Rashid, G. Dellaire, A. Cuddihy, F. Jalali, M. Vaid, C. Coackley et al. // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – № 23. – P. 10810-21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0729
35. Loughery J. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. / J. Loughery, M. Cox, L.M. Smith, D.W. Meek. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – № 12. – P. 7666-80. doi: 10.1093/nar/gku501
36. Saito S. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. / S. Saito, A.A. Goodarzi, Y. Higashimoto, Y. Noda, S.P. Lees-Miller, E. Appella et al. // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 15. – P. 12491-4. doi: 10.1074/jbc.C200093200
37. 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. Osipov, P. Eremin, N. Vorobyeva et al. // *Curr Issues Mol Biol.* – 2023. – V. 45. – № 9. – P. 7352-7373. doi: 10.3390/cimb45090465
38. Jezkova L. Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: a high-resolution microscopy analysis of gammaH2AX/53BP1 foci. / L. Jezkova, M. Zadneprianetc, E. Kulikova, E. Smirnova, T. Bulanova, D. Depes et al. // *Nanoscale.* – 2018. – V. 10. – № 3. – P. 1162-1179. doi: 10.1039/c7nr06829h
39. Osipov A. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts. / A. Osipov, A. Chigasova, E. Yashkina, M. Ignatov, Y. Fedotov, D. Molodtsova et al. // *Cells.* – 2023. – V. 12. – № 8. doi: 10.3390/cells12081209
40. Anglada T. Analysis of Residual DSBs in Ataxia-Telangiectasia Lymphoblast Cells Initiating Apoptosis. / T. Anglada, M. Terradas, L. Hernandez, A. Genesca, M. Martin. // *Biomed Res Int.* – 2016. – V. 2016. – P. 8279560. doi: 10.1155/2016/8279560

41. Olive P.L. Retention of gammaH2AX foci as an indication of lethal DNA damage. / P.L. Olive. // *Radiother Oncol.* – 2011. – V. 101. – № 1. – P. 18-23. doi: 10.1016/j.radonc.2011.05.055
42. Babayan N.S. Colony-forming ability and residual foci of DNA repair proteins in human lung fibroblasts irradiated with subpicosecond beams of accelerated electrons. / N.S. Babayan, D.V. Gur'ev, N.Y. Vorob'eva, B.A. Grigoryan, G.L. Tadevosyan, L.S. Apresyan et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2021. – V. 172. – № 7. – P. 30-33. doi: 10.47056/0365-9615-2021-172-7-30-33
43. Noren Hooten N. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. / N. Noren Hooten, M.K. Evans. // *J Vis Exp.* – 2017.10.3791/55533 – № 123. doi: 10.3791/55533
44. Oda T. DNA damage-induced cellular senescence is regulated by 53BP1 accumulation in the nuclear foci and phase separation. / T. Oda, N. Gotoh, T. Kasamatsu, H. Handa, T. Saitoh, N. Sasaki. // *Cell Prolif.* – 2023. – V. 56. – № 6. – P. e13398. doi: 10.1111/cpr.13398
45. Kudlova N. Cellular Senescence: Molecular Targets, Biomarkers, and Senolytic Drugs. / N. Kudlova, J.B. De Sanctis, M. Hajduch. // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23. – № 8. doi: 10.3390/ijms23084168
46. Tracy L.E. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. / L.E. Tracy, R.A. Minasian, E.J. Caterson. // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 2016. – V. 5. – № 3. – P. 119-136. doi: 10.1089/wound.2014.0561
47. Sorrell J.M. Clonal characterization of fibroblasts in the superficial layer of the adult human dermis. / J.M. Sorrell, M.A. Baber, A.I. Caplan. // *Cell Tissue Res.* – 2007. – V. 327. – № 3. – P. 499-510. doi: 10.1007/s00441-006-0317-y
48. Sorrell J.M. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. / J.M. Sorrell, M.A. Baber, A.I. Caplan. // *J Cell Physiol.* – 2004. – V. 200. – № 1. – P. 134-45. doi: 10.1002/jcp.10474

49. Nolte S.V. Diversity of fibroblasts - a review on implications for skin tissue engineering. / S.V. Nolte, W. Xu, H.O. Rennekampff, H.P. Rodemann. // *Cells Tissues Organs*. – 2008. – V. 187. – № 3. – P. 165-76. doi: 10.1159/000111805
50. Sorrell J.M. Fibroblast Heterogeneity: More Than Skin Deep. / J.M. Sorrell, and Arnold I. Caplan. // *Journal of Cell Science*. – 2004. – V. 117. – № 5. – P. 667-75.
51. Ali-Bahar M. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. / M. Ali-Bahar, B. Bauer, E.E. Tredget, A. Ghahary. // *Wound Repair Regen*. – 2004. – V. 12. – № 2. – P. 175-82. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.012110.x
52. Monika P. Myofibroblast progeny in wound biology and wound healing studies. / P. Monika, P.V. Waiker, M.N. Chandrababha, A. Rangarajan, K.N.C. Murthy. // *Wound Repair Regen*. – 2021. – V. 29. – № 4. – P. 531-547. doi: 10.1111/wrr.12937
53. Kiwanuka E. Harnessing growth factors to influence wound healing. / E. Kiwanuka, J. Junker, E. Eriksson. // *Clin Plast Surg*. – 2012. – V. 39. – № 3. – P. 239-48. doi: 10.1016/j.cps.2012.04.003
54. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. / P. Bainbridge. // *J Wound Care*. – 2013. – V. 22. – № 8. – P. 407-8, 410-12. doi: 10.12968/jowc.2013.22.8.407
55. Donovan J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. / J. Donovan, D. Abraham, J. Norman. // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2013. – V. 18. – № 1. – P. 106-19. doi: 10.2741/4090
56. Andrade Z.A. Interrelationship between adipocytes and fibroblasts during acute damage to the subcutaneous adipose tissue of rats: an ultrastructural study. / Z.A. Andrade, J. de-Oliveira-Filho, A.L. Fernandes. // *Braz J Med Biol Res*. – 1998. – V. 31. – № 5. – P. 659-64. doi: 10.1590/s0100-879x1998000500009
57. Matsumoto T. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. / T. Matsumoto, K. Kano, D. Kondo, N. Fukuda, Y. Iribe, N.

- Tanaka et al. // *J Cell Physiol.* – 2008. – V. 215. – № 1. – P. 210-22. doi: 10.1002/jcp.21304
58. Tholpady S.S. The cellular plasticity of human adipocytes. / S.S. Tholpady, C. Aojanepong, R. Llull, J.H. Jeong, A.C. Mason, J.W. Futrell et al. // *Ann Plast Surg.* – 2005. – V. 54. – № 6. – P. 651-6. doi: 10.1097/01.sap.0000158065.12174.40
59. Schrimpf C. Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. / C. Schrimpf, J.S. Duffield. // *Curr Opin Nephrol Hypertens.* – 2011. – V. 20. – № 3. – P. 297-305. doi: 10.1097/MNH.0b013e328344c3d4
60. Piera-Velazquez S. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. / S. Piera-Velazquez, Z. Li, S.A. Jimenez. // *Am J Pathol.* – 2011. – V. 179. – № 3. – P. 1074-80. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.001
61. Lee J.G. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1beta-induced FGF-2 in corneal endothelial cells. / J.G. Lee, M.K. Ko, E.P. Kay. // *Exp Eye Res.* – 2012. – V. 95. – № 1. – P. 35-9. doi: 10.1016/j.exer.2011.08.003
62. Lin F. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. / F. Lin, N. Wang, T.C. Zhang. // *IUBMB Life.* – 2012. – V. 64. – № 9. – P. 717-23. doi: 10.1002/iub.1059
63. Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. / K. Takahashi, S. Yamanaka. // *Cell.* – 2006. – V. 126. – № 4. – P. 663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
64. Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. / K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda et al. // *Cell.* – 2007. – V. 131. – № 5. – P. 861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
65. Yu J. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. / J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian et al. // *Science.* – 2007. – V. 318. – № 5858. – P. 1917-20. doi: 10.1126/science.1151526

66. Sorrell J.M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. / J.M. Sorrell, A.I. Caplan. // *J Cell Sci.* – 2004. – V. 117. – № Pt 5. – P. 667-75. doi: 10.1242/jcs.01005
67. Mine S. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. / S. Mine, N.O. Fortunel, H. Pigeon, D. Asselineau. // *PLoS One.* – 2008. – V. 3. – № 12. – P. e4066. doi: 10.1371/journal.pone.0004066
68. Yamaba H. Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging. / H. Yamaba, M. Haba, M. Kunita, T. Sakaida, H. Tanaka, Y. Yashiro et al. // *Exp Dermatol.* – 2016. – V. 25 Suppl 3. – P. 45-51. doi: 10.1111/exd.13084
69. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. / R. Kalluri. // *Nat Rev Cancer.* – 2016. – V. 16. – № 9. – P. 582-98. doi: 10.1038/nrc.2016.73
70. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. / B. Hinz. // *J Invest Dermatol.* – 2007. – V. 127. – № 3. – P. 526-37. doi: 10.1038/sj.jid.5700613
71. Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. / D. Sheppard. // *Proc Am Thorac Soc.* – 2006. – V. 3. – № 5. – P. 413-7. doi: 10.1513/pats.200601-008AW
72. Desmouliere A. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. / A. Desmouliere, C. Chaponnier, G. Gabbiani. // *Wound Repair Regen.* – 2005. – V. 13. – № 1. – P. 7-12. doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x
73. Greiling D. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. / D. Greiling, R.A. Clark. // *J Cell Sci.* – 1997. – V. 110 (Pt 7). – P. 861-70. doi: 10.1242/jcs.110.7.861
74. Li B. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. / B. Li, J.H. Wang. // *J Tissue Viability.* – 2011. – V. 20. – № 4. – P. 108-20. doi: 10.1016/j.jtv.2009.11.004
75. Alberts B B.D. *Molecular Biology of the Cell.* / B.D. Alberts B, Lewis J, Raff M, Roberts KWJ. // Garland Pub. Inc., London. – 2004.

76. Kim W.J. Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. / W.J. Kim, R.R. Mohan, R.R. Mohan, S.E. Wilson. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 1999. – V. 40. – № 7. – P. 1364-72.
77. Tomasek J.J. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. / J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 3. – № 5. – P. 349-63. doi: 10.1038/nrm809
78. Porock D. Management of radiation skin reactions: literature review and clinical application. / D. Porock, S. Nikoletti, L. Kristjanson. // *Plast Surg Nurs.* – 1999. – V. 19. – № 4. – P. 185-92, 223; quiz 191-2.
79. Wolff K.J. Fitzpatrick's Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology. / K.J. Wolff, R.; Saavedra, A. // – 2009. – P. p. 1104.
80. Ryan J.L. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly. / J.L. Ryan. // *J Invest Dermatol.* – 2012. – V. 132. – № 3 Pt 2. – P. 985-93. doi: 10.1038/jid.2011.411
81. Singh M. Radiodermatitis: A Review of Our Current Understanding. / M. Singh, A. Alavi, R. Wong, S. Akita. // *Am J Clin Dermatol.* – 2016. – V. 17. – № 3. – P. 277-92. doi: 10.1007/s40257-016-0186-4
82. Bray F.N. Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. / F.N. Bray, B.J. Simmons, A.H. Wolfson, K. Nouri. // *Dermatol Ther (Heidelb).* – 2016. – V. 6. – № 2. – P. 185-206. doi: 10.1007/s13555-016-0120-y
83. Gottlober P. [Cutaneous radiation syndrome: clinical features, diagnosis and therapy]. / P. Gottlober, G. Krahn, R.U. Peter. // *Hautarzt.* – 2000. – V. 51. – № 8. – P. 567-74. doi: 10.1007/s001050051173
84. Jaschke W. Radiation-Induced Skin Injuries to Patients: What the Interventional Radiologist Needs to Know. / W. Jaschke, M. Schmuth, A. Trianni, G. Bartal. // *Cardiovasc Intervent Radiol.* – 2017. – V. 40. – № 8. – P. 1131-1140. doi: 10.1007/s00270-017-1674-5
85. Borrelli M.R. Radiation-Induced Skin Fibrosis: Pathogenesis, Current Treatment Options, and Emerging Therapeutics. / M.R. Borrelli, A.H. Shen, G.K.

- Lee, A. Momeni, M.T. Longaker, D.C. Wan. // *Ann Plast Surg.* – 2019. – V. 83. – № 4S Suppl 1. – P. S59-S64. doi: 10.1097/SAP.0000000000002098
86. O'Donovan A. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin toxicity: a survey of practice across Europe and the USA. / A. O'Donovan, M. Coleman, R. Harris, P. Herst. // *Eur J Cancer Care (Engl).* – 2015. – V. 24. – № 3. – P. 425-35. doi: 10.1111/ecc.12213
87. Bentzen S.M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. / S.M. Bentzen. // *Nat Rev Cancer.* – 2006. – V. 6. – № 9. – P. 702-13. doi: 10.1038/nrc1950
88. Martin M. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? / M. Martin, J. Lefaix, S. Delanian. // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2000. – V. 47. – № 2. – P. 277-90. doi: 10.1016/s0360-3016(00)00435-1
89. Tibbs M.K. Wound healing following radiation therapy: a review. / M.K. Tibbs. // *Radiother Oncol.* – 1997. – V. 42. – № 2. – P. 99-106. doi: 10.1016/s0167-8140(96)01880-4
90. Pohlers D. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. / D. Pohlers, J. Brenmoehl, I. Loffler, C.K. Muller, C. Leipner, S. Schultze-Mosgau et al. // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – V. 1792. – № 8. – P. 746-56. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.004
91. Khanna K.K. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. / K.K. Khanna, S.P. Jackson. // *Nat Genet.* – 2001. – V. 27. – № 3. – P. 247-54. doi: 10.1038/85798
92. Symington L.S. Double-strand break end resection and repair pathway choice. / L.S. Symington, J. Gautier. // *Annu Rev Genet.* – 2011. – V. 45. – P. 247-71. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132435
93. Ceccaldi R. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. / R. Ceccaldi, B. Rondinelli, A.D. D'Andrea. // *Trends Cell Biol.* – 2016. – V. 26. – № 1. – P. 52-64. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.009
94. Ackerson S.M. To Join or Not to Join: Decision Points Along the Pathway to Double-Strand Break Repair vs. Chromosome End Protection. / S.M. Ackerson, C.

- Romney, P.L. Schuck, J.A. Stewart. // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 708763. doi: 10.3389/fcell.2021.708763
95. Rulten S.L. DNA strand break repair and neurodegeneration. / S.L. Rulten, K.W. Caldecott. // *DNA Repair (Amst).* – 2013. – V. 12. – № 8. – P. 558-67. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.008
96. Ghosh R. The Role for the DSB Response Pathway in Regulating Chromosome Translocations. / R. Ghosh, D. Das, S. Franco. // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – V. 1044. – P. 65-87. doi: 10.1007/978-981-13-0593-1_6
97. Li T. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. / T. Li, Z.J. Chen. // *J Exp Med.* – 2018. – V. 215. – № 5. – P. 1287-1299. doi: 10.1084/jem.20180139
98. Maremonti E. In vivo assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*. / E. Maremonti, D.M. Eide, L.M. Rossbach, O.C. Lind, B. Salbu, D.A. Brede. // *Free Radic Biol Med.* – 2020. – V. 152. – P. 583-596. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.037
99. Schuch A.P. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. / A.P. Schuch, C.C. Garcia, K. Makita, C.F. Menck. // *Photochem Photobiol Sci.* – 2013. – V. 12. – № 8. – P. 1259-72. doi: 10.1039/c3pp00004d
100. Harper J.W. The DNA damage response: ten years after. / J.W. Harper, S.J. Elledge. // *Mol Cell.* – 2007. – V. 28. – № 5. – P. 739-45. doi: 10.1016/j.molcel.2007.11.015
101. Kouranti I. Protein degradation in DNA damage response. / I. Kouranti, A. Peyroche. // *Semin Cell Dev Biol.* – 2012. – V. 23. – № 5. – P. 538-45. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.02.004
102. Hau P.M. Role of ATM in the formation of the replication compartment during lytic replication of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal epithelial cells. / P.M. Hau, W. Deng, L. Jia, J. Yang, T. Tsurumi, A.K. Chiang et al. // *J Virol.* – 2015. – V. 89. – № 1. – P. 652-68. doi: 10.1128/JVI.01437-14

103. Ciccia A. The DNA damage response: making it safe to play with knives. / A. Ciccia, S.J. Elledge. // *Mol Cell*. – 2010. – V. 40. – № 2. – P. 179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019
104. Mirza-Aghazadeh-Attari M. DNA damage response and repair in colorectal cancer: Defects, regulation and therapeutic implications. / M. Mirza-Aghazadeh-Attari, S.G. Darband, M. Kaviani, A. Mihanfar, J. Aghazadeh Attari, B. Yousefi et al. // *DNA Repair (Amst)*. – 2018. – V. 69. – P. 34-52. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.07.005
105. Heijink A.M. The DNA damage response during mitosis. / A.M. Heijink, M. Krajewska, M.A. van Vugt. // *Mutat Res*. – 2013. – V. 750. – № 1-2. – P. 45-55. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.003
106. Hau P.M. Epstein-Barr Virus Hijacks DNA Damage Response Transducers to Orchestrate Its Life Cycle. / P.M. Hau, S.W. Tsao. // *Viruses*. – 2017. – V. 9. – № 11. doi: 10.3390/v9110341
107. Blackford A.N. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. / A.N. Blackford, S.P. Jackson. // *Molecular Cell*. – 2017. – V. 66. – № 6. – P. 801-817. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015
108. Polo S.E. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. / S.E. Polo, S.P. Jackson. // *Genes & Development*. – 2011. – V. 25. – № 5. – P. 409-433. doi: 10.1101/gad.2021311
109. Sancar A. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. / A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Ünsal-Kaçmaz, S. Linn. // *Annual Review of Biochemistry*. – 2004. – V. 73. – № 1. – P. 39-85. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
110. Okazaki R. Role of p53 in Regulating Radiation Responses. / R. Okazaki. // *Life*. – 2022. – V. 12. – № 7. doi: 10.3390/life12071099
111. Rai R. DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression. / R. Rai, G. Peng, K. Li, S.Y. Lin. // *Cancer Genomics Proteomics*. – 2007. – V. 4. – № 2. – P. 99-106.

112. Lieber M.R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. / M.R. Lieber. // *J Biol Chem.* – 2008. – V. 283. – № 1. – P. 1-5. doi: 10.1074/jbc.R700039200
113. San Filippo J. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. / J. San Filippo, P. Sung, H. Klein. // *Annu Rev Biochem.* – 2008. – V. 77. – P. 229-57. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255
114. Davis A.J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. / A.J. Davis, D.J. Chen. // *Transl Cancer Res.* – 2013. – V. 2. – № 3. – P. 130-143. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02
115. McVey M. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. / M. McVey, S.E. Lee. // *Trends Genet.* – 2008. – V. 24. – № 11. – P. 529-38. doi: 10.1016/j.tig.2008.08.007
116. Kennedy R.D. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. / R.D. Kennedy, A.D. D'Andrea. // *Genes Dev.* – 2005. – V. 19. – № 24. – P. 2925-40. doi: 10.1101/gad.1370505
117. Blasiak J. Single-Strand Annealing in Cancer. / J. Blasiak. // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22. – № 4. doi: 10.3390/ijms22042167
118. Seol J.H. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. / J.H. Seol, E.Y. Shim, S.E. Lee. // *Mutat Res.* – 2018. – V. 809. – P. 81-87. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002
119. Al-Minawi A.Z. The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. / A.Z. Al-Minawi, N. Saleh-Gohari, T. Helleday. // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36. – № 1. – P. 1-9. doi: 10.1093/nar/gkm888
120. Cimprich K.A. ATR: an essential regulator of genome integrity. / K.A. Cimprich, D. Cortez. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – № 8. – P. 616-27. doi: 10.1038/nrm2450
121. Bartek J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. / J. Bartek, J. Lukas. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2007. – V. 19. – № 2. – P. 238-45. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.009

122. Riley T. Transcriptional control of human p53-regulated genes. / T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – № 5. – P. 402-12. doi: 10.1038/nrm2395
123. Kastan M.B. Cell-cycle checkpoints and cancer. / M.B. Kastan, J. Bartek. // *Nature.* – 2004. – V. 432. – № 7015. – P. 316-23. doi: 10.1038/nature03097
124. Huen M.S. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. / M.S. Huen, J. Chen. // *Cell Res.* – 2008. – V. 18. – № 1. – P. 8-16. doi: 10.1038/cr.2007.109
125. Matsuoka S. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. / S. Matsuoka, B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo et al. // *Science.* – 2007. – V. 316. – № 5828. – P. 1160-6. doi: 10.1126/science.1140321
126. Campisi J. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. / J. Campisi, F. d'Adda di Fagagna. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – V. 8. – № 9. – P. 729-40. doi: 10.1038/nrm2233
127. Halazonetis T.D. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. / T.D. Halazonetis, V.G. Gorgoulis, J. Bartek. // *Science.* – 2008. – V. 319. – № 5868. – P. 1352-5. doi: 10.1126/science.1140735
128. Misteli T. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. / T. Misteli, E. Soutoglou. // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – № 4. – P. 243-54. doi: 10.1038/nrm2651
129. Xiao A. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. / A. Xiao, H. Li, D. Shechter, S.H. Ahn, L.A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage et al. // *Nature.* – 2009. – V. 457. – № 7225. – P. 57-62. doi: 10.1038/nature07668
130. Cook P.J. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. / P.J. Cook, B.G. Ju, F. Telese, X. Wang, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld. // *Nature.* – 2009. – V. 458. – № 7238. – P. 591-6. doi: 10.1038/nature07849

131. Dellaire G Beyond repair foci: subnuclear domains and the cellular response to DNA damage. / G. Dellaire, D.P. Bazett-Jones. // *Cell Cycle*. – 2007. – V. 6. – № 15. – P. 1864-72. doi: 10.4161/cc.6.15.4560
132. Haaf T. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. / T. Haaf, E.I. Golub, G. Reddy, C.M. Radding, D.C. Ward. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1995. – V. 92. – № 6. – P. 2298-302. doi: 10.1073/pnas.92.6.2298
133. Maser R.S. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. / R.S. Maser, K.J. Monsen, B.E. Nelms, J.H. Petrini. // *Mol Cell Biol*. – 1997. – V. 17. – № 10. – P. 6087-96. doi: 10.1128/MCB.17.10.6087
134. Stracker T.H. The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. / T.H. Stracker, J.W. Theunissen, M. Morales, J.H. Petrini. // *DNA Repair (Amst)*. – 2004. – V. 3. – № 8-9. – P. 845-54. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.014
135. Stiff T. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. / T. Stiff, M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich, P.A. Jeggo. // *Cancer Res*. – 2004. – V. 64. – № 7. – P. 2390-6. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3207
136. Rogakou E.P. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. / E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner. // *J Cell Biol*. – 1999. – V. 146. – № 5. – P. 905-16. doi: 10.1083/jcb.146.5.905
137. Paull T.T. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. / T.T. Paull, E.P. Rogakou, V. Yamazaki, C.U. Kirchgessner, M. Gellert, W.M. Bonner. // *Curr Biol*. – 2000. – V. 10. – № 15. – P. 886-95. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00610-2
138. Burma S. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. / S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa, D.J. Chen. // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276. – № 45. – P. 42462-7. doi: 10.1074/jbc.C100466200

139. Ward I.M. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. / I.M. Ward, J. Chen. // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276. – № 51. – P. 47759-62. doi: 10.1074/jbc.C100569200
140. Schultz L.B. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. / L.B. Schultz, N.H. Chehab, A. Malikzay, T.D. Halazonetis. // *J Cell Biol.* – 2000. – V. 151. – № 7. – P. 1381-90. doi: 10.1083/jcb.151.7.1381
141. Shang Y.L. NFBBD1, a novel nuclear protein with signature motifs of FHA and BRCT, and an internal 41-amino acid repeat sequence, is an early participant in DNA damage response. / Y.L. Shang, A.J. Boder, P.L. Chen. // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 8. – P. 6323-9. doi: 10.1074/jbc.M210749200
142. Goldberg M. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. / M. Goldberg, M. Stucki, J. Falck, D. D'Amours, D. Rahman, D. Pappin et al. // *Nature.* – 2003. – V. 421. – № 6926. – P. 952-6. doi: 10.1038/nature01445
143. Petrini J.H. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. / J.H. Petrini, T.H. Stracker. // *Trends Cell Biol.* – 2003. – V. 13. – № 9. – P. 458-62. doi: 10.1016/s0962-8924(03)00170-3
144. Lee A.C. Specific association of mouse MDC1/NFBBD1 with NBS1 at sites of DNA-damage. / A.C. Lee, O. Fernandez-Capetillo, V. Pisupati, S.P. Jackson, A. Nussenzweig. // *Cell Cycle.* – 2005. – V. 4. – № 1. – P. 177-82. doi: 10.4161/cc.4.1.1354
145. Spector D.L. Nuclear domains. / D.L. Spector. // *J Cell Sci.* – 2001. – V. 114. – № Pt 16. – P. 2891-3. doi: 10.1242/jcs.114.16.2891
146. Dellaire G. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. / G. Dellaire, D.P. Bazett-Jones. // *Bioessays.* – 2004. – V. 26. – № 9. – P. 963-77. doi: 10.1002/bies.20089
147. Lobrich M. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. / M. Lobrich, A. Shibata, A.

- Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A.A. Goodarzi et al. // *Cell Cycle*. – 2010. – V. 9. – № 4. – P. 662-9. doi: 10.4161/cc.9.4.10764
148. Olive P.L. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. / P.L. Olive. // *Methods Cell Biol.* – 2004. – V. 75. – P. 355-73. doi: 10.1016/s0091-679x(04)75014-1
149. Nakamura A. Techniques for gamma-H2AX detection. / A. Nakamura, O.A. Sedelnikova, C. Redon, D.R. Pilch, N.I. Sinogeeva, R. Shroff et al. // *Methods Enzymol.* – 2006. – V. 409. – P. 236-50. doi: 10.1016/S0076-6879(05)09014-2
150. Rothkamm K. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. / K. Rothkamm, S. Horn. // *Ann Ist Super Sanita.* – 2009. – V. 45. – № 3. – P. 265-71.
151. Ivashkevich A. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. / A. Ivashkevich, C.E. Redon, A.J. Nakamura, R.F. Martin, O.A. Martin. // *Cancer Lett.* – 2012. – V. 327. – № 1-2. – P. 123-33. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.025
152. Pouliliou S. Gamma histone 2AX (gamma-H2AX) as a predictive tool in radiation oncology. / S. Pouliliou, M.I. Koukourakis. // *Biomarkers.* – 2014. – V. 19. – № 3. – P. 167-80. doi: 10.3109/1354750X.2014.898099
153. Vignard J. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. / J. Vignard, G. Mirey, B. Salles. // *Radiother Oncol.* – 2013. – V. 108. – № 3. – P. 362-9. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.013
154. Barnard S. The first gamma-H2AX biodosimetry intercomparison exercise of the developing European biodosimetry network RENEB. / S. Barnard, E.A. Ainsbury, J. Al-hafidh, V. Hadjidekova, R. Hristova, C. Lindholm et al. // *Radiat Prot Dosimetry.* – 2015. – V. 164. – № 3. – P. 265-70. doi: 10.1093/rpd/ncu259
155. Tanaka T. Cytometric analysis of DNA damage: phosphorylation of histone H2AX as a marker of DNA double-strand breaks (DSBs). / T. Tanaka, D. Halicka, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz. // *Methods Mol Biol.* – 2009. – V. 523. – P. 161-8. doi: 10.1007/978-1-59745-190-1_11

156. Rosen D.B. Quantitative measurement of alterations in DNA damage repair (DDR) pathways using single cell network profiling (SCNP). / D.B. Rosen, L.Y. Leung, B. Louie, J.A. Cordeiro, A. Conroy, I. Shapira et al. // *J Transl Med.* – 2014. – V. 12. – P. 184. doi: 10.1186/1479-5876-12-184
157. Horn S. Combined analysis of gamma-H2AX/53BP1 foci and caspase activation in lymphocyte subsets detects recent and more remote radiation exposures. / S. Horn, S. Barnard, D. Brady, K.M. Prise, K. Rothkamm. // *Radiat Res.* – 2013. – V. 180. – № 6. – P. 603-9. doi: 10.1667/RR13342.1
158. Kondo T. [Radiation-induced cell death]. / T. Kondo. // *Nihon Rinsho.* – 2012. – V. 70. – № 3. – P. 389-93.
159. Galluzzi L. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. / L. Galluzzi, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis et al. // *Cell Death Differ.* – 2018. – V. 25. – № 3. – P. 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
160. Proskuryakov S.Y. Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. / S.Y. Proskuryakov, V.L. Gabai, A.G. Konoplyannikov. // *Biochemistry (Mosc).* – 2002. – V. 67. – № 4. – P. 387-408. doi: 10.1023/a:1015289521275
161. Lauber K. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. / K. Lauber, A. Ernst, M. Orth, M. Herrmann, C. Belka. // *Front Oncol.* – 2012. – V. 2. – P. 116. doi: 10.3389/fonc.2012.00116
162. Kerr J.F. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. / J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie. // *Br J Cancer.* – 1972. – V. 26. – № 4. – P. 239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33
163. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. / S. Elmore. // *Toxicol Pathol.* – 2007. – V. 35. – № 4. – P. 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
164. Yang S. Apoptosis-inducing factor (AIF) nuclear translocation mediated caspase-independent mechanism involves in X-ray-induced MCF-7 cell death. / S. Yang, J. Huang, P. Liu, J. Li, S. Zhao. // *Int J Radiat Biol.* – 2017. – V. 93. – № 3. – P. 270-278. doi: 10.1080/09553002.2016.1254833

165. Johnson L. Role of intrinsic apoptosis in environmental exposure health outcomes. / L. Johnson, K.A. Sarosiek. // Trends Mol Med. – 2024. – V. 30. – № 1. – P. 56-73. doi: 10.1016/j.molmed.2023.11.003
166. Ghibelli L. Multistep and multitask Bax activation. / L. Ghibelli, M. Diederich. // Mitochondrion. – 2010. – V. 10. – № 6. – P. 604-13. doi: 10.1016/j.mito.2010.08.003
167. Mehlen P. Dependence receptors: from basic research to drug development. / P. Mehlen, D.E. Bredesen. // Sci Signal. – 2011. – V. 4. – № 157. – P. mr2. doi: 10.1126/scisignal.2001521
168. D'Arcy M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. / M.S. D'Arcy. // Cell Biol Int. – 2019. – V. 43. – № 6. – P. 582-592. doi: 10.1002/cbin.11137
169. Ying Y. Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? / Y. Ying, B.J. Padanilam. // Cell Mol Life Sci. – 2016. – V. 73. – № 11-12. – P. 2309-24. doi: 10.1007/s00018-016-2202-5
170. Rodriguez-Rocha H. DNA damage and autophagy. / H. Rodriguez-Rocha, A. Garcia-Garcia, M.I. Panayiotidis, R. Franco. // Mutat Res. – 2011. – V. 711. – № 1-2. – P. 158-66. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.007
171. Yao R. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. / R. Yao, J. Shen. // MedComm (2020). – 2023. – V. 4. – № 5. – P. e347. doi: 10.1002/mco2.347
172. Mortimore G.E. Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. / G.E. Mortimore, B.R. Lardeux, C.E. Adams. // J Biol Chem. – 1988. – V. 263. – № 5. – P. 2506-12.
173. Chaurasia M. Radiation-induced autophagy: mechanisms and consequences. / M. Chaurasia, A.N. Bhatt, A. Das, B.S. Dwarakanath, K. Sharma. // Free Radic Res. – 2016. – V. 50. – № 3. – P. 273-90. doi: 10.3109/10715762.2015.1129534

174. Denton D. Autophagy-dependent cell death. / D. Denton, S. Kumar. // *Cell Death Differ.* – 2019. – V. 26. – № 4. – P. 605-616. doi: 10.1038/s41418-018-0252-y
175. Li C. Connexin43 Modulates X-Ray-Induced Pyroptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. / C. Li, M. Tian, Q. Gou, Y.R. Jia, X. Su. // *Biomed Environ Sci.* – 2019. – V. 32. – № 3. – P. 177-188. doi: 10.3967/bes2019.025
176. Linder B. Autophagy in Cancer Cell Death. / B. Linder, D. Kogel. // *Biology (Basel).* – 2019. – V. 8. – № 4. doi: 10.3390/biology8040082
177. Kabeya Y. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. / Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda et al. // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 21. – P. 5720-8. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720
178. Roshani-Asl E. Interaction between DNA damage response and autophagy in colorectal cancer. / E. Roshani-Asl, B. Mansori, A. Mohammadi, S. Najafi, F. Danesh-Pouya, Y. Rasmi. // *Gene.* – 2020. – V. 730. – P. 144323. doi: 10.1016/j.gene.2019.144323
179. Ney P.A. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. / P.A. Ney. // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – V. 1853. – № 10 Pt B. – P. 2775-83. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.02.022
180. Marcotte R. Replicative senescence revisited. / R. Marcotte, E. Wang. // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* – 2002. – V. 57. – № 7. – P. B257-69. doi: 10.1093/gerona/57.7.b257
181. Raghuram G.V. Stress induced premature senescence: a new culprit in ovarian tumorigenesis? / G.V. Raghuram, P.K. Mishra. // *Indian J Med Res.* – 2014. – V. 140 Suppl. – № Suppl 1. – P. S120-9.
182. Kim J.H. Radiation-induced senescence: therapeutic opportunities. / J.H. Kim, S.L. Brown, M.N. Gordon. // *Radiat Oncol.* – 2023. – V. 18. – № 1. – P. 10. doi: 10.1186/s13014-022-02184-2
183. van Deursen J.M. The role of senescent cells in ageing. / J.M. van Deursen. // *Nature.* – 2014. – V. 509. – № 7501. – P. 439-46. doi: 10.1038/nature13193

184. Basisty N. The power of proteomics to monitor senescence-associated secretory phenotypes and beyond: toward clinical applications. / N. Basisty, A. Kale, S. Patel, J. Campisi, B. Schilling. // *Expert Rev Proteomics*. – 2020. – V. 17. – № 4. – P. 297-308. doi: 10.1080/14789450.2020.1766976
185. Rao S.G. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! / S.G. Rao, J.G. Jackson. // *Trends Cancer*. – 2016. – V. 2. – № 11. – P. 676-687. doi: 10.1016/j.trecan.2016.10.001
186. Di Leonardo A. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. / A. Di Leonardo, S.P. Linke, K. Clarkin, G.M. Wahl. // *Genes Dev*. – 1994. – V. 8. – № 21. – P. 2540-51. doi: 10.1101/gad.8.21.2540
187. Toussaint O. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. / O. Toussaint, E.E. Medrano, T. von Zglinicki. // *Exp Gerontol*. – 2000. – V. 35. – № 8. – P. 927-45. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00180-7
188. Allsopp R.C. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. / R.C. Allsopp, H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E.V. Younglai, A.B. Futcher et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1992. – V. 89. – № 21. – P. 10114-8. doi: 10.1073/pnas.89.21.10114
189. Di Micco R. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. / R. Di Micco, M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise et al. // *Nature*. – 2006. – V. 444. – № 7119. – P. 638-42. doi: 10.1038/nature05327
190. Bartkova J. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. / J. Bartkova, N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva et al. // *Nature*. – 2006. – V. 444. – № 7119. – P. 633-7. doi: 10.1038/nature05268
191. Shay J.W. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. / J.W. Shay, I.B. Roninson. // *Oncogene*. – 2004. – V. 23. – № 16. – P. 2919-33. doi: 10.1038/sj.onc.1207518

192. Toussaint O. Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. / O. Toussaint, P. Dumont, J.F. Dierick, T. Pascal, C. Fripiat, F. Chainiaux et al. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2000. – V. 908. – P. 85-98. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06638.x
193. Serrano M. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. / M. Serrano, A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, S.W. Lowe. // *Cell.* – 1997. – V. 88. – № 5. – P. 593-602. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81902-9
194. Dimri G.P. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. / G.P. Dimri, K. Itahana, M. Acosta, J. Campisi. // *Mol Cell Biol.* – 2000. – V. 20. – № 1. – P. 273-85. doi: 10.1128/MCB.20.1.273-285.2000
195. Jacobs J.J. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. / J.J. Jacobs, P. Keblusek, E. Robanus-Maandag, P. Kristel, M. Lingbeek, P.M. Nederlof et al. // *Nat Genet.* – 2000. – V. 26. – № 3. – P. 291-9. doi: 10.1038/81583
196. Bringold F. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. / F. Bringold, M. Serrano. // *Exp Gerontol.* – 2000. – V. 35. – № 3. – P. 317-29. doi: 10.1016/s0531-5565(00)00083-8
197. Pearson M. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. / M. Pearson, R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito et al. // *Nature.* – 2000. – V. 406. – № 6792. – P. 207-10. doi: 10.1038/35018127
198. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. / J. Campisi. // *Trends Cell Biol.* – 2001. – V. 11. – № 11. – P. S27-31. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02151-1
199. Bandyopadhyay D. Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. / D. Bandyopadhyay, N.A. Okan, E. Bales, L. Nascimento, P.A. Cole, E.E. Medrano. // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – № 21. – P. 6231-9.

200. Macip S. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. / S. Macip, M. Igarashi, P. Berggren, J. Yu, S.W. Lee, S.A. Aaronson. // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – № 23. – P. 8576-85. doi: 10.1128/MCB.23.23.8576-8585.2003
201. Masgras I. Reactive oxygen species and mitochondrial sensitivity to oxidative stress determine induction of cancer cell death by p21. / I. Masgras, S. Carrera, P.J. de Verdier, P. Brennan, A. Majid, W. Makhtar et al. // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287. – № 13. – P. 9845-9854. doi: 10.1074/jbc.M111.250357
202. Althubiti M. BTK Modulates p53 Activity to Enhance Apoptotic and Senescent Responses. / M. Althubiti, M. Rada, J. Samuel, J.M. Escorsa, H. Najeeb, K.G. Lee et al. // *Cancer Res.* – 2016. – V. 76. – № 18. – P. 5405-14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0690
203. Rada M. BTK blocks the inhibitory effects of MDM2 on p53 activity. / M. Rada, M. Althubiti, A.E. Ekpenyong-Akiba, K.G. Lee, K.P. Lam, O. Fedorova et al. // *Oncotarget.* – 2017. – V. 8. – № 63. – P. 106639-106647. doi: 10.18632/oncotarget.22543
204. Rada M. BTK: a two-faced effector in cancer and tumour suppression. / M. Rada, N. Barlev, S. Macip. // *Cell Death Dis.* – 2018. – V. 9. – № 11. – P. 1064. doi: 10.1038/s41419-018-1122-8
205. Jacobs J.J. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. / J.J. Jacobs, K. Kieboom, S. Marino, R.A. DePinho, M. van Lohuizen. // *Nature.* – 1999. – V. 397. – № 6715. – P. 164-8. doi: 10.1038/16476
206. Lundberg A.S. Genes involved in senescence and immortalization. / A.S. Lundberg, W.C. Hahn, P. Gupta, R.A. Weinberg. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2000. – V. 12. – № 6. – P. 705-9. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00155-1
207. Ohtani N. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. / N. Ohtani, Z. Zebedee, T.J. Huot, J.A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi et al. // *Nature.* – 2001. – V. 409. – № 6823. – P. 1067-70. doi: 10.1038/35059131

208. Macip S. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. / S. Macip, M. Igarashi, L. Fang, A. Chen, Z.Q. Pan, S.W. Lee et al. // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 9. – P. 2180-8. doi: 10.1093/emboj/21.9.2180
209. Sherr C.J. The RB and p53 pathways in cancer. / C.J. Sherr, F. McCormick. // *Cancer Cell.* – 2002. – V. 2. – № 2. – P. 103-12. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00102-2
210. Chen Q.M. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. / Q.M. Chen, J.C. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J.D. Reagan, B.N. Ames. // *Biochem J.* – 1998. – V. 332 (Pt 1). – № Pt 1. – P. 43-50. doi: 10.1042/bj3320043
211. Gonzalez L.C. Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad? / L.C. Gonzalez, S. Ghadaouia, A. Martinez, F. Rodier. // *Biogerontology.* – 2016. – V. 17. – № 1. – P. 71-87. doi: 10.1007/s10522-015-9593-9
212. Althubiti M. Detection of Senescent Cells by Extracellular Markers Using a Flow Cytometry-Based Approach. / M. Althubiti, S. Macip. // *Methods Mol Biol.* – 2017. – V. 1534. – P. 147-153. doi: 10.1007/978-1-4939-6670-7_14
213. Chandler H. Stressing the cell cycle in senescence and aging. / H. Chandler, G. Peters. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2013. – V. 25. – № 6. – P. 765-71. doi: 10.1016/j.ceb.2013.07.005
214. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. / J. Campisi. // *Annu Rev Physiol.* – 2013. – V. 75. – P. 685-705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653
215. Rodier F. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. / F. Rodier, D.P. Munoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik et al. // *J Cell Sci.* – 2011. – V. 124. – № Pt 1. – P. 68-81. doi: 10.1242/jcs.071340
216. Debacq-Chainiaux F. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in

- vivo. / F. Debacq-Chainiaux, J.D. Erusalimsky, J. Campisi, O. Toussaint. // *Nat Protoc.* – 2009. – V. 4. – № 12. – P. 1798-806. doi: 10.1038/nprot.2009.191
217. Dimri G.P. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. / G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1995. – V. 92. – № 20. – P. 9363-7. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363
218. Kuilman T. The essence of senescence. / T. Kuilman, C. Michaloglou, W.J. Mooi, D.S. Peeper. // *Genes Dev.* – 2010. – V. 24. – № 22. – P. 2463-79. doi: 10.1101/gad.1971610
219. Althubiti M. Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. / M. Althubiti, L. Lezina, S. Carrera, R. Jukes-Jones, S.M. Giblett, A. Antonov et al. // *Cell Death Dis.* – 2014. – V. 5. – № 11. – P. e1528. doi: 10.1038/cddis.2014.489
220. Kim K.M. Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. / K.M. Kim, J.H. Noh, M. Bodogai, J.L. Martindale, X. Yang, F.E. Indig et al. // *Genes Dev.* – 2017. – V. 31. – № 15. – P. 1529-1534. doi: 10.1101/gad.302570.117
221. Kim K.M. SCAMP4 enhances the senescent cell secretome. / K.M. Kim, J.H. Noh, M. Bodogai, J.L. Martindale, P.R. Pandey, X. Yang et al. // *Genes Dev.* – 2018. – V. 32. – № 13-14. – P. 909-914. doi: 10.1101/gad.313270.118
222. Munshi A. Clonogenic cell survival assay. / A. Munshi, M. Hobbs, R.E. Meyn. // *Methods Mol Med.* – 2005. – V. 110. – P. 21-8. doi: 10.1385/1-59259-869-2:021
223. Puck T.T. Action of x-rays on mammalian cells. / T.T. Puck, P.I. Marcus. // *J Exp Med.* – 1956. – V. 103. – № 5. – P. 653-66. doi: 10.1084/jem.103.5.653
224. Chang D.S. Radiation Survival Models, SLD, PLD, and Dose Rate / D.S. Chang, F.D. Lasley, I.J. Das, M.S. Mendonca, J.R. Dynlacht. // *Basic Radiotherapy Physics and Biology.* – 2021. – P. 243-253.
225. McMahon S.J. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. / S.J. McMahon. // *Physics in Medicine & Biology.* – 2018. – V. 64. – № 1. doi: 10.1088/1361-6560/aaf26a

226. Li P. Hypoxia enhances stemness of cancer stem cells in glioblastoma: an in vitro study. / P. Li, C. Zhou, L. Xu, H. Xiao. // *Int J Med Sci.* – 2013. – V. 10. – № 4. – P. 399-407. doi: 10.7150/ijms.5407
227. Jain M.V. Nuclear localized Akt enhances breast cancer stem-like cells through counter-regulation of p21(Waf1/Cip1) and p27(kip1). / M.V. Jain, J.R. Jangamreddy, J. Grabarek, F. Schweizer, T. Klonisch, A. Cieslar-Pobuda et al. // *Cell Cycle.* – 2015. – V. 14. – № 13. – P. 2109-20. doi: 10.1080/15384101.2015.1041692
228. Neering S.J. Leukemia stem cells in a genetically defined murine model of blast-crisis CML. / S.J. Neering, T. Bushnell, S. Sozer, J. Ashton, R.M. Rossi, P.Y. Wang et al. // *Blood.* – 2007. – V. 110. – № 7. – P. 2578-85. doi: 10.1182/blood-2007-02-073031
229. Franken N.A. Clonogenic assay of cells in vitro. / N.A. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree. // *Nat Protoc.* – 2006. – V. 1. – № 5. – P. 2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339
230. Rouaud M. Probability, Statistics and Estimation. / M. Rouaud, 2013.
231. Lutz W.K. Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships, exemplified for mutagenicity data. / W.K. Lutz, R.W. Lutz. // *Mutat Res.* – 2009. – V. 678. – № 2. – P. 118-22. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.05.010
232. Mathematica. – Version 13.3 ed. – Champaign, Illinois: Wolfram Research, Inc., 2023.
233. Asaithamby A. Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. / A. Asaithamby, D.J. Chen. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – № 12. – P. 3912-23. doi: 10.1093/nar/gkp237
234. Osipov A.N. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells. / A.N. Osipov, M. Pustovalova, A. Grekhova, P. Eremin, N. Vorobyova, A. Pulin et al. // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6. – № 29. – P. 27275-87. doi: 10.18632/oncotarget.4739

235. Granzotto A. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. / A. Granzotto, M.A. Benadjaoud, G. Vogin, C. Devic, M.L. Ferlazzo, L. Bodgi et al. // *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. – 2016. – V. 94. – № 3. – P. 450-460. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.11.013
236. Chai W. Evaluation of Low-dose Radiation-induced DNA Damage and Repair in 3D Printed Human Cellular Constructs. / W. Chai, Y. Kong, M.B. Escalona, C. Hu, A.S. Balajee, Y. Huang. // *Health Physics*. – 2023. – V. 125. – № 3. – P. 175-185. doi: 10.1097/hp.0000000000001709
237. Grekhova A.K. Evaluation of the Contribution of Homologous Recombination in DNA Double-Strand Break Repair in Human Fibroblasts after Exposure to Low and Intermediate Doses of X-ray Radiation. / A.K. Grekhova, M.V. Pustovalova, P.S. Eremin, I.V. Ozerov, O.A. Maksimova, A.V. Gordeev et al. // *Biology Bulletin*. – 2020. – V. 46. – № 11. – P. 1496-1502. doi: 10.1134/s1062359019110037
238. Laurier D. The scientific basis for the use of the linear no-threshold (LNT) model at low doses and dose rates in radiological protection. / D. Laurier, Y. Billarand, D. Klokov, K. Leuraud. // *J Radiol Prot*. – 2023. – V. 43. – № 2. doi: 10.1088/1361-6498/acdfd7
239. Calabrese E. Linear Non-Threshold (LNT) historical discovery milestones. / E. Calabrese. // *Med Lav*. – 2022. – V. 113. – № 4. – P. e2022033. doi: 10.23749/mdl.v113i4.13381
240. Selby P.B. How self-interest and deception led to the adoption of the linear non-threshold dose response (LNT) model for cancer risk assessment. / P.B. Selby, E.J. Calabrese. // *Sci Total Environ*. – 2023. – V. 898. – P. 165402. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165402
241. Hendry J.H. ICRP Publication 131: Stem cell biology with respect to carcinogenesis aspects of radiological protection. / J.H. Hendry, O. Niwa, M.H.

- Barcellos-Hoff, R.K. Globus, J.D. Harrison, M.T. Martin et al. // *Ann ICRP.* – 2016. – V. 45. – № 1 Suppl. – P. 239-52. doi: 10.1177/0146645315621849
242. Maier A.B. Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. / A.B. Maier, R.G. Westendorp, V.A.N.H. D. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2007. – V. 1100. – P. 323-32. doi: 10.1196/annals.1395.035
243. Pustovalova M. Residual gammaH2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. / M. Pustovalova, C. Astrelina, A. Grekhova, N. Vorobyeva, A. Tsvetkova, T. Blokhina et al. // *Aging (Albany NY).* – 2017. – V. 9. – № 11. – P. 2397-2410. doi: 10.18632/aging.101327
244. Miller I. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. / I. Miller, M. Min, C. Yang, C. Tian, S. Gookin, D. Carter et al. // *Cell Rep.* – 2018. – V. 24. – № 5. – P. 1105-1112 e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.110
245. Sobecki M. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. / M. Sobecki, K. Mrouj, A. Camasses, N. Parisi, E. Nicolas, D. Lleres et al. // *Elife.* – 2016. – V. 5. – P. e13722. doi: 10.7554/eLife.13722
246. Sobecki M. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. / M. Sobecki, K. Mrouj, J. Colinge, F. Gerbe, P. Jay, L. Krasinska et al. // *Cancer Res.* – 2017. – V. 77. – № 10. – P. 2722-2734. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0707
247. Hansen T.E. Following autophagy step by step. / T.E. Hansen, T. Johansen. // *BMC Biol.* – 2011. – V. 9. – P. 39. doi: 10.1186/1741-7007-9-39
248. Tanida I. LC3 and Autophagy. / I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami. // *Methods Mol Biol.* – 2008. – V. 445. – P. 77-88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4
249. Boice A. Targeting apoptotic caspases in cancer. / A. Boice, L. Bouchier-Hayes. // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2020. – V. 1867. – № 6. – P. 118688. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118688
250. Tsapras P. Caspase involvement in autophagy. / P. Tsapras, I.P. Nezis. // *Cell Death Differ.* – 2017. – V. 24. – № 8. – P. 1369-1379. doi: 10.1038/cdd.2017.43

251. Panneer Selvam S. Balance between senescence and apoptosis is regulated by telomere damage-induced association between p16 and caspase-3. / S. Panneer Selvam, B.M. Roth, R. Nganga, J. Kim, M.A. Cooley, K. Helke et al. // *J Biol Chem.* – 2018. – V. 293. – № 25. – P. 9784-9800. doi: 10.1074/jbc.RA118.003506
252. Eskandari E. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. / E. Eskandari, C.J. Eaves. // *J Cell Biol.* – 2022. – V. 221. – № 6. doi: 10.1083/jcb.202201159
253. Noda A. Radiation-induced unrepairable DSBs: their role in the late effects of radiation and possible applications to biodosimetry. / A. Noda. // *J Radiat Res.* – 2018. – V. 59. – № suppl_2. – P. ii114-ii120. doi: 10.1093/jrr/rrx074
254. Vaurijoux A. Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells. / A. Vaurijoux, P. Voisin, A. Freneau, J.F. Barquinero, G. Gruel. // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2017. – V. 797-799. – P. 15-25. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.03.003
255. Velegzhaninov I.O. Low dose ionizing irradiation suppresses cellular senescence in normal human fibroblasts. / I.O. Velegzhaninov, A.V. Ermakova, D.Y. Klokov. // *Int J Radiat Biol.* – 2018. – V. 94. – № 9. – P. 825-828. doi: 10.1080/09553002.2018.1492167
256. Pantelis P. The Dual Role of Oxidative-Stress-Induced Autophagy in Cellular Senescence: Comprehension and Therapeutic Approaches. / P. Pantelis, G. Theocharous, N. Lagopati, D. Veroutis, D.F. Thanos, G.P. Lampoglou et al. // *Antioxidants (Basel).* – 2023. – V. 12. – № 1. doi: 10.3390/antiox12010169
257. Marcotte R. Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. / R. Marcotte, C. Lacelle, E. Wang. // *Mech Ageing Dev.* – 2004. – V. 125. – № 10-11. – P. 777-83. doi: 10.1016/j.mad.2004.07.007
258. di Masi A. PML nuclear body disruption impairs DNA double-strand break sensing and repair in APL. / A. di Masi, D. Cilli, F. Berardinelli, A. Talarico, I. Pallavicini, R. Pennisi et al. // *Cell Death Dis.* – 2016. – V. 7. – P. e2308. doi: 10.1038/cddis.2016.115

259. Scully R. Double strand break repair functions of histone H2AX. / R. Scully, A. Xie. // *Mutat Res.* – 2013. – V. 750. – № 1-2. – P. 5-14. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007
260. Lamarche B.J. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. / B.J. Lamarche, N.I. Orazio, M.D. Weitzman. // *FEBS Lett.* – 2010. – V. 584. – № 17. – P. 3682-95. doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.029
261. Merighi A. The Phosphorylated Form of the Histone H2AX (gammaH2AX) in the Brain from Embryonic Life to Old Age. / A. Merighi, N. Gionchiglia, A. Granato, L. Lossi. // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – № 23. doi: 10.3390/molecules26237198
262. Yan W. Structural basis of gammaH2AX recognition by human PTIP BRCT5-BRCT6 domains in the DNA damage response pathway. / W. Yan, Z. Shao, F. Li, L. Niu, Y. Shi, M. Teng et al. // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – № 24. – P. 3874-9. doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.045
263. Bakkenist C.J. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. / C.J. Bakkenist, M.B. Kastan. // *Nature.* – 2003. – V. 421. – № 6922. – P. 499-506. doi: 10.1038/nature01368 nature01368 [pii]
264. Firsanov D.V. H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. / D.V. Firsanov, L.V. Solovjeva, M.P. Svetlova. // *Clin Epigenetics.* – 2011. – V. 2. – № 2. – P. 283-97. doi: 10.1007/s13148-011-0044-4
265. Kinner A. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. / A. Kinner, W. Wu, C. Staudt, G. Iliakis. // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36. – № 17. – P. 5678-94. doi: 10.1093/nar/gkn550
266. Mirman Z. 53BP1: a DSB escort. / Z. Mirman, T. de Lange. // *Genes Dev.* – 2020. – V. 34. – № 1-2. – P. 7-23. doi: 10.1101/gad.333237.119
267. Derbyshire D.J. Crystal structure of human 53BP1 BRCT domains bound to p53 tumour suppressor. / D.J. Derbyshire, B.P. Basu, L.C. Serpell, W.S. Joo, T.

- Date, K. Iwabuchi et al. // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 14. – P. 3863-72. doi: 10.1093/emboj/cdf383
268. Zimmermann M. 53BP1: pro choice in DNA repair. / M. Zimmermann, T. de Lange. // *Trends Cell Biol.* – 2014. – V. 24. – № 2. – P. 108-17. doi: 10.1016/j.tcb.2013.09.003
269. Lei T. Multifaceted regulation and functions of 53BP1 in NHEJ-mediated DSB repair (Review). / T. Lei, S. Du, Z. Peng, L. Chen. // *Int J Mol Med.* – 2022. – V. 50. – № 1. doi: 10.3892/ijmm.2022.5145
270. Meek D.W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? / D.W. Meek. // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – V. 9. – № 10. – P. 714-23. doi: 10.1038/nrc2716
271. Mirzayans R. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. / R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, D. Murray. // *J Biomed Biotechnol.* – 2012. – V. 2012. – P. 170325. doi: 10.1155/2012/170325
272. Rothkamm K. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. / K. Rothkamm, I. Kruger, L.H. Thompson, M. Lobrich. // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – № 16. – P. 5706-15. doi: 10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003
273. Neumaier T. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. / T. Neumaier, J. Swenson, C. Pham, A. Polyzos, A.T. Lo, P. Yang et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V. 109. – № 2. – P. 443-8. doi: 10.1073/pnas.1117849108
274. Kuhne M. Physical and biological parameters affecting DNA double strand break misrejoining in mammalian cells. / M. Kuhne, K. Rothkamm, M. Lobrich. // *Radiat Prot Dosimetry.* – 2002. – V. 99. – № 1-4. – P. 129-32. doi: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a006742
275. Menegakis A. Residual gammaH2AX foci after ex vivo irradiation of patient samples with known tumour-type specific differences in radio-responsiveness. / A. Menegakis, C. De Colle, A. Yaromina, J. Hennenlotter, A. Stenzl, M. Scharpf et al.

- // Radiother Oncol. – 2015. – V. 116. – № 3. – P. 480-5. doi: 10.1016/j.radonc.2015.08.006
276. Meneceur S. Residual gammaH2AX foci in head and neck squamous cell carcinomas as predictors for tumour radiosensitivity: Evaluation in pre-clinical xenograft models and clinical specimens. / S. Meneceur, S. Lock, V. Gudziol, S. Hering, R. Butof, M. Rehm et al. // Radiother Oncol. – 2019. – V. 137. – P. 24-31. doi: 10.1016/j.radonc.2019.04.009
277. Vorobyeva N.Y. Changes in the Number of Residual gammaH2AX 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. // Bull Exp Biol Med. – 2023. – V. 175. – № 4. – P. 450-453. doi: 10.1007/s10517-023-05883-2
278. Matsui T. Robustness of Clonogenic Assays as a Biomarker for Cancer Cell Radiosensitivity. / T. Matsui, E. Nuryadi, S. Komatsu, Y. Hirota, A. Shibata, T. Oike et al. // Int J Mol Sci. – 2019. – V. 20. – № 17. doi: 10.3390/ijms20174148
279. Brix N. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. / N. Brix, D. Samaga, R. Hennel, K. Gehr, H. Zitzelsberger, K. Lauber. // Radiat Oncol. – 2020. – V. 15. – № 1. – P. 248. doi: 10.1186/s13014-020-01697-y
280. Oike T. Reporting of methodologies used for clonogenic assays to determine radiosensitivity. / T. Oike, S. Komatsu, Y. Komatsu, A. Nachankar, N.D.M. Darwis, A. Shibata et al. // J Radiat Res. – 2020. – V. 61. – № 6. – P. 828-831. doi: 10.1093/jrr/rraa064
281. Domon M. A Biological Variability Model of Cell Survival Curves. / M. Domon. // Radiation Research. – 1980. – V. 82. – № 3. doi: 10.2307/3575326
282. Vassiliev O.N. Accumulation of sublethal radiation damage and its effect on cell survival. / O.N. Vassiliev. // Physics in Medicine & Biology. – 2022. – V. 68. – № 1. doi: 10.1088/1361-6560/aca5e7
283. Bloomer W.D. The mammalian radiation survival curve. / W.D. Bloomer, S.J. Adelstein. // J Nucl Med. – 1982. – V. 23. – № 3. – P. 259-65.

284. Miller R.C. Recovery from X-ray induced damage in primary cultures of human skin fibroblast cells. / R.C. Miller, M. Enno, M. Yamane, M. Nishiki. // *J Radiat Res.* – 1985. – V. 26. – № 3. – P. 339-45. doi: 10.1269/jrr.26.339
285. Schmitt C.A. Cellular senescence and cancer treatment. / C.A. Schmitt. // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – V. 1775. – № 1. – P. 5-20. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.08.005
286. Ojha R. Caspase-mediated crosstalk between autophagy and apoptosis: Mutual adjustment or matter of dominance. / R. Ojha, M. Ishaq, S.K. Singh. // *J Cancer Res Ther.* – 2015. – V. 11. – № 3. – P. 514-24. doi: 10.4103/0973-1482.163695
287. Kwon Y. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. / Y. Kwon, J.W. Kim, J.A. Jeoung, M.S. Kim, C. Kang. // *Mol Cells.* – 2017. – V. 40. – № 9. – P. 607-612. doi: 10.14348/molcells.2017.0151
288. Young A.R. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. / A.R. Young, M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J.F. Darot et al. // *Genes Dev.* – 2009. – V. 23. – № 7. – P. 798-803. doi: 10.1101/gad.519709
289. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. / J. Campisi. // *Cell.* – 2005. – V. 120. – № 4. – P. 513-22. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.003
290. Carafa V. Deregulation of Cell Death in Cancer: Recent Highlights. / V. Carafa, L. Altucci. // *Cancers (Basel).* – 2020. – V. 12. – № 12. doi: 10.3390/cancers12123517
291. Li M. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. / M. Li, L. You, J. Xue, Y. Lu. // *Front Pharmacol.* – 2018. – V. 9. – P. 522. doi: 10.3389/fphar.2018.00522
292. Yang J. The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. / J. Yang, M. Liu, D. Hong, M. Zeng, X. Zhang. // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 722205. doi: 10.3389/fcell.2021.722205

293. Hovest M.G. Senescence of human fibroblasts after psoralen photoactivation is mediated by ATR kinase and persistent DNA damage foci at telomeres. / M.G. Hovest, N. Bruggenolte, K.S. Hosseini, T. Krieg, G. Herrmann. // *Mol Biol Cell*. – 2006. – V. 17. – № 4. – P. 1758-67. doi: 10.1091/mbc.e05-08-0701
294. Berardinelli F. The role of telomere length modulation in delayed chromosome instability induced by ionizing radiation in human primary fibroblasts. / F. Berardinelli, A. Antoccia, R. Buonsante, S. Gerardi, R. Cherubini, V. De Nadal et al. // *Environ Mol Mutagen*. – 2013. – V. 54. – № 3. – P. 172-9. doi: 10.1002/em.21761
295. Gewirtz D.A. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. / D.A. Gewirtz. // *Autophagy*. – 2013. – V. 9. – № 5. – P. 808-12. doi: 10.4161/auto.23922

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).