

С.А. Корнева¹, А.К. Чигасова^{1,2,3}, А.А. Осипов², М.А. Игнатов^{1,2}, Н.Ю. Воробьева^{1,2},
В.О. Сабуров⁴, Е.И. Казаков⁴, С.Н. Корякин⁴, Ю.А. Федотов^{1,2}, А.Ю. Бушманов¹, А.Н. Осипов^{1,2}

ПОСТРАДИАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ФОКУСОВ БЕЛКОВ γ H2AX и pATM В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ОБЛУЧЕННЫХ НЕЙТРОНАМИ 14,1 МЭВ

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

⁴ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Контактное лицо: Андреян Николаевич Осипов, e-mail: andreyan.radbio@gmail.com

РЕФЕРАТ

Цель: Сравнительный анализ дозовых зависимостей и кинетики пострadiационных изменений количества фокусов белков γ H2AX и pATM в мезенхимальных стволовых клетках человека (МСК), подвергшихся воздействию нейтронов с энергией 14,1 МэВ и гамма-излучения кобальта-60.

Материал и методы: В работе использовали первичную культуру МСК человека, полученную из коллекции ООО «БиолоТ» (Россия). Облучение клеток проводили на нейтронном генераторе НГ-14 (ФГУП «ВНИИА», Россия), обеспечивавшим потоки нейтронов с энергией 14,1 МэВ, и гамма-терапевтическом аппарате «РОКУС-АМ» (АО «Равенство», Россия; кобальт-60, мощность дозы 0,5 Гр/мин) в дозах 0,1, 0,25 и 0,5 Гр. Для количественной оценки фокусов γ H2AX и pATM использовали иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител к γ H2AX и pATM соответственно. Статистическую значимость оценивали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты: Показано, что кинетика пострadiационных изменений количества фокусов γ H2AX в клетках, облученных нейтронами, является более медленной, чем после облучения гамма-излучением. Через 24 ч после облучения нейтронами регистрировалось ~ 62 % фокусов γ H2AX и ~ 52 % фокусов pATM от их количества через 0,5 ч после облучения. Эти значения были статистически значимо ($p < 0,001$) выше долей остаточных фокусов, рассчитанных после воздействия гамма-излучения: ~ 16 % и 6 % соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что доля сложных, трудных для репарации повреждений ДНК в клетках, облученных нейтронами, значительно выше, чем при облучении гамма-излучением.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, быстрые нейтроны, гамма-излучение, γ H2AX, pATM, повреждения ДНК, репарация ДНК

Для цитирования: Корнева С.А., Чигасова А.К., Осипов А.А., Игнатов М.А., Воробьева Н.Ю., Сабуров В.О., Казаков Е.И., Корякин С.Н., Федотов Ю.А., Бушманов А.Ю., Осипов А.Н. Пострадиационные изменения количества фокусов белков γ H2AX и pATM в мезенхимальных стволовых клетках человека, облученных нейтронами 14,1 МэВ // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 3. С. 11–15. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-3-11-15

S.A. Korneva¹, A.K. Chigasova^{1,2,3}, A.A. Osipov², M.A. Ignatov^{1,2}, N.Yu. Vorobyova^{1,2},
V.O. Saburov⁴, E.I. Kazakov⁴, S.N. Koryakin⁴, Yu.A. Fedotov^{1,2}, A.Yu. Bushmanov¹, A.N. Osipov^{1,2}

Post-Irradiation Changes in the Number of γ H2AX and pATM Protein Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Irradiated with 14.1 MeV Neutrons

¹ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

³ Institute of Biochemical Physics, Moscow, Russia

⁴ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

Contact person: A.N. Osipov, e-mail: andreyan.radbio@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: Comparative analysis of dose-response dependences and kinetics of post-radiation changes in the number of γ H2AX and pATM protein foci in human mesenchymal stem cells (MSCs) exposed to 14.1 MeV neutrons and cobalt-60 gamma-radiation.

Material and methods: The study used a primary culture of human MSCs obtained from the collection of BioloT LLC (Russia). The cells were irradiated using a neutron generator NG-14 (VNIIA, Russia), which provided neutron fluxes with an energy of 14.1 MeV, and a gamma-therapeutic device ROKUS-AM (JSC Ravenstvo, Russia; cobalt-60, dose rate 0.5 Gy/min) at doses of 0.1, 0.25 and 0.5 Gy. For quantitative assessment of γ H2AX and pATM foci, immunocytochemical staining was done using antibodies to γ H2AX and pATM, respectively. Statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA).

Results: It was shown that the kinetics of post-radiation changes in the number of γ H2AX foci in cells irradiated with neutrons is slower than after gamma irradiation. 24 h after irradiation with neutrons, ~ 62 % of γ H2AX foci and ~ 52 % of pATM foci were recorded from their number 0.5 h after irradiation. These values were statistically significantly ($p < 0.001$) higher than the proportions of residual foci calculated after exposure to gamma-radiation: ~ 16 % and 6 %, respectively. The results obtained indicate that the proportion of complex, difficult-to-repair DNA damage in cells irradiated with neutrons is significantly higher than with gamma-radiation.

Keywords: *mesenchymal stem cells, fast neutrons, gamma-radiation, γ H2AX, pATM, DNA damage, DNA repair*

For citation: Korneva SA, Chigasova AK, Osipov AA, Ignatov MA, Vorobyova NYu, Saburov VO, Kazakov EI, Koryakin SN, Fedotov YuA, Bushmanov AYU, Osipov AN. Post-Irradiation Changes in the Number of γ H2AX and pATM Protein Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Irradiated with 14.1 MeV Neutrons. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2025;70(3):11–15. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-3-11-15

Оценка биологических эффектов нейтронного излучения крайне важна для космической радиобиологии, лучевой терапии и радиационной защиты. Нейтроны, взаимодействуя с атомами клеток и межклеточной среды, индуцируют каскады вторичных частиц (протонов, альфа-частиц и т.д.), которые формируют сложные повреждения клеточных структур, в том числе и ДНК. Среди радиационно-индуцированных повреждений ДНК различных типов, наиболее опасными являются двуниевые разрывы (ДР) ДНК [1–3]. Точность и эффективность процесса репарации этих повреждений фактически определяют дальнейшую судьбу облучённых клеток: обновление или ограничение пролиферации, старение и гибель [4]. В клетках, которые продолжают делиться, несмотря на ошибки репарации ДНК, увеличивается вероятность онкологической трансформации [5]. Считается, что одной из основных причин нестабильности генома, канцерогенеза и старения является накопление генетических нарушений вследствие некорректной репарации ДНК от ДР [6–8].

Иммуноцитохимический анализ белков, участвующих в отклике клеток на повреждение ДНК (англ. DNA damage response – DDR), позволяет получать уникальную информацию о пострадиационных изменениях количества сайтов репарации ДНК и их распределения по объёму ядра каждой клетки [9]. Сотни и тысячи копий этих белков образуют динамические фокальные микро-структуры, 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 используются такие названия как фокусы повреждения ДНК [10, 11] или фокусы белков репарации ДНК [12, 13]. Среди белков, образующих фокусы, наиболее изученными являются H2AX, фосфорилированный по серину 139 (γ H2AX) [14–16], 53BP1 (p53-связывающий белок 1 – p53-binding protein 1) [17, 18] и ATM (мутантный белок при атаке телеангиэктазии – ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein), фосфорилированный по серину 1981 (pATM) [19, 20].

Вариант корового гистона H2A – H2AX в ответ на образование повреждения ДНК фосфорилируется киназами семейства фосфатидилинозитол-3-киназ: ATM, DNA-РК (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 [21]. 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 [22].

Целью работы является сравнительный анализ дозовых зависимостей и кинетики пострадиационных изменений количества фокусов белков γ H2AX и pATM в мезенхимальных стволовых клетках человека (МСК), подвергшихся воздействию нейтронов с энергией 14,1 МэВ и гамма-излучения кобальта-60.

Материал и методы

Культура клеток и условия культивирования

В работе использовали первичную культуру МСК из жировой ткани человека 5–6 пассажа, полученную из коллекции ООО «БиолоТ» (Россия). Для экспериментов клетки культивировали в среде DMEM (1 г/л глюкозы) (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Thermo Fisher Scientific, США) в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37 °C, 5 % CO₂) в течение 3 пассажей, со сменой среды один раз в три дня.

Облучение

Облучение клеток проводили в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиале ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России на нейтронном генераторе НГ-14 (ФГУП ВНИИА, Россия), обеспечившим потоки нейтронов с энергией 14,1 МэВ, и гамма-терапевтическом аппарате «РОКУС-АМ» (АО «Равенство», Россия; кобальт-60, мощность дозы 0,5 Гр/мин) в дозах 0,1, 0,25 и 0,5 Гр. Дозиметрия нейтронного поля осуществлялась с помощью радиометра быстрых нейтронов РБН (Частное учреждение «ИТЭР-Центр», Россия). Дозиметрия гамма-облучения выполнялась согласно методике TRS-398 rev.1 при помощи Unidos Webline и ионизационной камерой типа Farmer ТМ30013 (PTW, Германия) Погрешность дозиметрии нейтронного излучения не превышала 5 %. Погрешность дозиметрии гамма-излучения – 2 %.

После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях CO₂ инкубатора (37 °C, 5 % CO₂) в течение 0,5 (дозовые зависимости) или 0,5–24 ч (кинетика пострадиационных изменений количества фокусов).

Иммуноцитохимический анализ

Для фиксации клеток использовали 4 % раствор параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) (pH 7,4). Фиксацию проводили в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем препараты дважды промывали PBS с последующей инкубацией в течение 1 ч в 0,3 % растворе TritonX100 в PBS с добавлением 5 % сыворотки козы для пермеабиллизации и блокирования неспецифического связывания антител. После этого препараты инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными антителами к тем или иным белкам, разведенными в PBS с 1 % бычьим сывороточным альбумином (BSA). Использовали следующие первичные антитела: моноклональные антитела кролика к γ H2AX (phospho S139) (разведение 1:800, клон EP854(2)Y, Abcam, США); моноклональные антитела мыши к pATM (phospho S1981) (разведение 1:400, клон 10H11.E12, Abcam, 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) В-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.).

Статистический анализ

Статистический и математический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.2.161 (GraphPad Software). Результаты представлены как среднее арифметическое результатов \pm стандартная погрешность среднего (SEM). Статистическую значимость проверяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы были изучены зависимости между дозой излучения и количеством радиационно-индуцированных фокусов через 0,5 ч после облучения клеток в дозах от 0,1–0,5 Гр. Выбор этой временной точки был обусловлен тем, что для фокусов γ H2AX и pATM 0,5 ч после облучения МСК является точкой максимума [23].

Результаты исследования представлены на рис. 1 и 2. Было показано, что после облучения МСК нейтронным или гамма-излучением в дозах от 0,1 до 0,5 Гр отмечается дозозависимое увеличение количества фокусов γ H2AX и pATM.

Зависимости доза–эффект для фокусов γ H2AX аппроксимируются уравнениями линейной регрессии:

$$y = 15,7x + 3,0 \quad (R^2 = 0,97) \text{ – нейтронное излучение;}$$

$$y = 18,0x + 3,2 \quad (R^2 = 0,97) \text{ – гамма-излучение,}$$

где y – среднее количество фокусов в клеточном ядре, x – доза облучения в Гр. В пересчете на единицу поглощенной дозы количественный выход фокусов исследованных белков в МСК через 0,5 ч после облучения 14,1 МэВ нейтронами составляет $15,7 \pm 1,9$, а после облучения гамма-излучением – $18,0 \pm 2,2$ фокуса на клетку/Гр.

Зависимости доза–эффект для фокусов pATM описываются уравнениями линейной регрессии:

$$y = 10,5x + 1,5 \quad (R^2 = 0,98) \text{ – нейтронное излучение;}$$

$$y = 11,5x + 1,2 \quad (R^2 = 0,99) \text{ – гамма-излучение,}$$

где y – среднее количество фокусов в клеточном ядре, x – доза облучения в Гр. В пересчете на единицу поглощенной дозы количественный выход фокусов исследованных белков в МСК через 0,5 ч после облучения нейтронами составляет $10,5 \pm 0,3$, а после облучения гамма-излучением $11,5 \pm 0,1$ фокуса на клетку/Гр.

В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что после облучения нейтронами количественный выход фокусов γ H2AX и pATM в МСК несколько ниже, чем после облучения гамма-излучением. Однако важно не только количество повреждений, но и сложность.

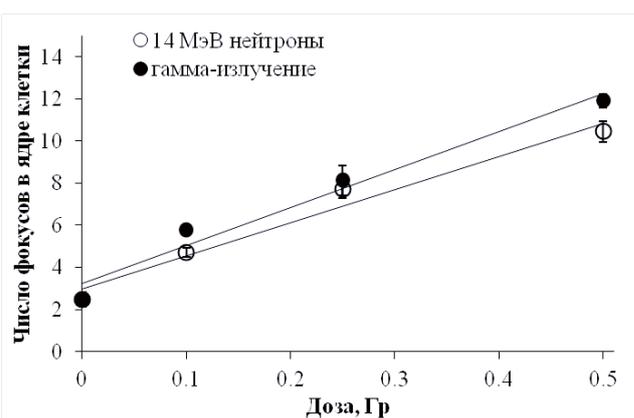


Рис. 1. Зависимости изменений количества фокусов γ H2AX от поглощенной дозы 14,1 МэВ нейтронного излучения или гамма-излучения кобальта-60 в мезенхимальных стволовых клетках человека 30 мин после облучения

Fig. 1. Dependences of changes in the number of γ H2AX foci on the absorbed dose of 14,1 MeV neutron radiation or gamma radiation of cobalt-60 in human mesenchymal stem cells 30 min after irradiation

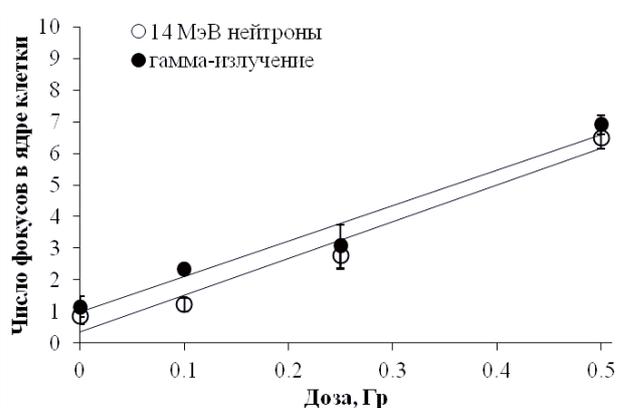


Рис. 2. Зависимости изменений количества фокусов pATM от поглощенной дозы 14,1 МэВ нейтронного излучения или гамма-излучения кобальта-60 в мезенхимальных стволовых клетках человека 30 мин после облучения

Fig. 2. Dependences of changes in the number of pATM foci on the absorbed dose of 14,1 MeV neutron radiation or gamma radiation of cobalt-60 in human mesenchymal stem cells 30 min after irradiation

Известно, что репарация ДНК от простых повреждений происходит намного быстрее, чем от сложных [24]. Поэтому нами были проведены исследования кинетики пострадиационных изменений количества фокусов γ H2AX и pATM в клетках облученных нейтронами или гамма-излучением. Результаты представлены на рис. 3 и 4 соответственно. Обращает на себя более медленная кинетика элиминации фокусов в клетках, облученных нейтронами по сравнению с клетками, облученными гамма-излучением. Через 24 ч после облучения нейтронами регистрировалось $\sim 62\%$ фокусов γ H2AX и $\sim 52\%$ фокусов pATM от их количества через 0,5 ч после облучения. Эти значения были статистически значимо ($p < 0,001$) выше долей остаточных фокусов, рассчитанных после воздействия гамма-излучения: $\sim 16\%$ и 6% соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что доля сложных повреждений ДНК в клетках, облученных нейтронами 14,1 МэВ, значительно выше, чем при облучении гамма-излучением.

Заключение

Проведен сравнительный анализ дозовых зависимостей кинетики пострадиационных изменений коли-

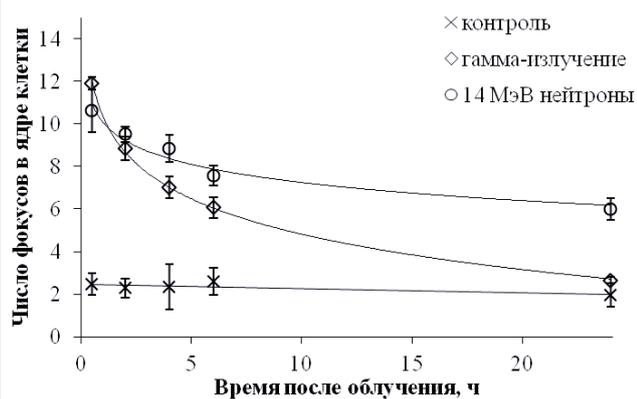


Рис. 3. Кинетика пострадиационных изменений количества фокусов γ H2AX в мезенхимальных стволовых клетках человека, облученных в дозе 0,5 Гр нейтронами 14,1 МэВ или гамма-излучением кобальта-60

Fig. 3. Kinetics of post-radiation changes in the number of γ H2AX foci in human mesenchymal stem cells irradiated at a dose of 0.5 Gy with 14.1 MeV neutrons or gamma radiation of cobalt-60

чества фокусов белка репарации ДНК γ H2AX и pATM в мезенхимальных стволовых клетках человека, подвергшихся воздействию нейтронов 14,1 МэВ и гамма-излучения кобальта-60. Показано, что кинетика пострадиационных изменений количества фокусов γ H2AX в клетках, облученных нейтронами является более медленной, чем после облучения гамма-излучением. Полученные результаты свидетельствуют о том, что

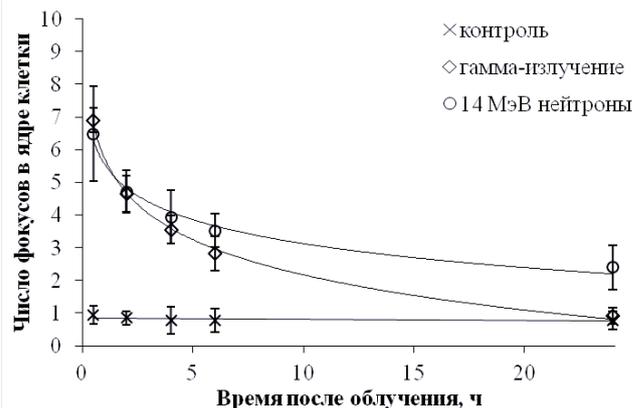


Рис. 4. Кинетика пострадиационных изменений количества фокусов pATM в мезенхимальных стволовых клетках человека, облученных в дозе 0,5 Гр нейтронами 14,1 МэВ или гамма-излучением кобальта-60

Fig. 4. Kinetics of post-radiation changes in the number of pATM foci in human mesenchymal stem cells irradiated at a dose of 0.5 Gy with 14.1 MeV neutrons or cobalt-60 gamma radiation

доля сложных, трудных для репарации повреждений ДНК в клетках, облученных нейтронами значительно выше, чем при облучении гамма-излучением. В целом, иммуноцитохимический анализ фокусов белков репарации ДНК представляется весьма перспективным для изучения механизмов ДНК повреждающего действия ионизирующего излучения с различной ОБЭ и микродозиметрии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Nickoloff J.A., Sharma N., Allen C.P., Taylor L., Allen S.J., Jaiswal A.S., et al. Roles of Homologous Recombination in Response to Ionizing Radiation-Induced DNA Damage. *Int J Radiat Biol.* 2023;99:6:903-14. doi: 10.1080/09553002.2021.1956001.
- Mladenov E., Mladenova V., Stuschke M., Iliakis G. New Facets of DNA Double Strand Break Repair: Radiation Dose as Key Determinant of HR Versus c-NHEJ Engagement. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24:19:49-56. doi: 10.3390/ijms241914956.
- Belov O., Chigasova A., Pustovalova M., Osipov A., Eremin P., Vorobyeva N., et al. Dose-Dependent Shift in Relative Contribution of Homologous Recombination to DNA Repair after Low-LET Ionizing Radiation Exposure: Empirical Evidence and Numerical Simulation. *Current Issues in Molecular Biology.* 2023;45:9:7352-73. doi: 10.3390/cimb45090465.
- Krenning L., van den Berg J., Medema R.H. Life or Death after a Break: what Determines the Choice? *Mol Cell.* 2019;76:2:346-58. doi: 10.1016/j.molcel.2019.08.023.
- Torgovnick A., Schumacher B. DNA Repair Mechanisms in Cancer Development and Therapy. *Front Genet.* 2015;6:157. doi: 10.3389/fgene.2015.00157.
- White R.R., Vijg J. Do DNA Double-Strand Breaks Drive Aging? *Mol Cell.* 2016;63:5:729-38. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.004.
- Jiang Y. Contribution of Microhomology to Genome Instability: Connection between DNA Repair and Replication Stress. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022;23:21:129-37. doi: 10.3390/ijms232112937.
- Sishc B.J., Davis A.J. The Role of the Core Non-Homologous End Joining Factors in Carcinogenesis and Cancer. *Cancers (Basel).* 2017;9:7:81. doi: 10.3390/cancers9070081.
- Osipov A., Chigasova A., Yashkina E., Ignatov M., Vorobyeva N., Zyuzikov N., et al. Early and Late Effects of Low-Dose X-ray Exposure in Human Fibroblasts: DNA Repair Foci, Proliferation, Autophagy, and Senescence. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024;25:15:8253. doi: 10.3390/ijms25158253.
- Barbieri S., Babini G., Morini J., Friedland W., Buonanno M., Grilj V., et al. Predicting DNA Damage Foci and their Experimental Readout with 2D Microscopy: a Unified Approach Applied to Photon and Neutron Exposures. *Sci Rep.* 2019;9:1:14019. doi: 10.1038/s41598-019-50408-5.
- Rothkamm K., Barnard S., Moquet J., Ellender M., Rana Z., Burdak-Rothkamm S. DNA Damage Foci: Meaning and Significance. *Environ Mol Mutagen.* 2015;56:6:491-504. doi: 10.1002/em.21944.
- Penninckx S., Pariset E., Cekanaviciute E., Costes S.V. Quantification of Radiation-Induced DNA Double Strand Break Repair Foci to Evaluate and Predict Biological Responses to Ionizing Radiation. *NAR Cancer.* 2021;3:4:zcab046. doi: 10.1093/narcan/zcab046.
- Belyaev I.Y. Radiation-Induced DNA Repair Foci: Spatio-Temporal Aspects of Formation, Application for Assessment of Radiosensitivity and Biological Dosimetry. *Mutat Res.* 2010;704:1-3:132-41. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.011.
- Wanotayan R., Chousanguntorn K., Petisiwaweth P., Anuttra T., Lertchanyaphan W., Jaikuna T., et al. A Deep Learning Model (FociRad) for Automated Detection of Gamma-H2AX Foci and Radiation Dose Estimation. *Sci Rep.* 2022;12:1:5527. doi: 10.1038/s41598-022-09180-2.
- Vorobyeva N.Y., Osipov A.A., Chigasova A.K., Yashkina E.I., Osipov A.N. Changes in the Number of Residual γ H2AX Foci in Ki-67-Positive and Ki-67-Negative Human Fibroblasts Irradiated with X-Rays in Doses of 2-10 Gy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2023;175:4:450-3. doi: 10.1007/s10517-023-05883-2.
- Vorobyeva N.Y., Astrelina T.A., Yashkina E.I., Chigasova A.K., Osipov A.A., Usupzhanova D.Y., et al. Effect of a Humic-Fulvic Acid Preparation on the Quantitative Yield of Residual γ H2AX Foci and Proliferative Activity in Irradiated Human Mesenchymal Stromal Cells. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2023;68:2:11-5. doi: 10.33266/1024-6177-2023-68-2-11-5.
- Falasci A., Chiramonte A., Testi S., Scarpato R. Dual Immunofluorescence of gammaH2AX and 53BP1 in Human Peripheral Lymphocytes. *J Vis Exp.* 2023;197:654-72. doi: 10.3791/65472.

18. Vorobyeva N.Y., Osipov A.A., Chigasova A.K., Pustovalova M.V., Kabanov D.I., Barchukov V.G., et al. Comparative Study of Changes in the γ H2ax and 53bp1 Foci Number in Human Mesenchymal Stromal Cells Incubated with 3H-thymidine or Tritiated Water. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2023;68;3:5-10. doi: 10.33266/1024-6177-2023-68-3-5-10.
19. Slonina D., Kowalczyk A., Janecka-Widla A., Kabat D., Szatkowski W., Biesaga B. Low-Dose Hypersensitive Response for Residual pATM and gammaH2AX Foci in Normal Fibroblasts of Cancer Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018;100;3:756-66. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.10.054.
20. Chigasova A.K., Pustovalova M.V., Osipov A.A., Korneva S.A., Eremin P.S., Yashkina E.I., et al. Post-Radiation Changes in The Number of Phosphorylated H2ax and Atm Protein Foci in Low Dose X-Ray Irradiated Human Mesenchymal Stem Cells. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2024;69;1:15-9. doi: 10.33266/1024-6177-2024-69-1-15-19.
21. Valente D., Gentileschi M.P., Guerrisi A., Bruzzaniti V., Morrone A., Soddu S., et al. Factors to Consider for the Correct Use of gammaH2AX in the Evaluation of DNA Double-Strand Breaks Damage Caused by Ionizing Radiation. *Cancers (Basel)*. 2022;14;24:6204. doi: 10.3390/cancers14246204.
22. Shibata A., Jeggo P.A. ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Genes (Basel)*. 2021;12;9:1370. doi: 10.3390/genes12091370.
23. Osipov A.N., Pustovalova M., Grekhova A., Eremin P., Vorobyova N., Pulin A., et al. Low Doses of X-Rays Induce Prolonged and ATM-Independent Persistence of GammaH2AX Foci in Human Gingival Mesenchymal Stem Cells. *Oncotarget*. 2015;6;29:27275-87. doi: 10.18632/oncotarget.4739.
24. Ozerov I.V., Osipov A.N. Kinetic Model of DNA Double-Strand Break Repair in Primary Human Fibroblasts Exposed to Low-LET Irradiation with Various Dose Rates. *Computer Research and Modeling*. 2015;7;1:159-76. doi: 10.20537/2076-7633-2015-7-1-159-176.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследования выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 1023112000035-8, шифр «Космос-ДНК»).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.02.2025. **Принята к публикации:** 25.03.2025.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The research was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. 1023112000035-8, code "Cosmos-DNA").

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.02.2025. **Accepted for publication:** 25.03.2025.