ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ -
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ А.И.БУРНАЗЯНА»

На правах рукописи

САЛЕЕВА ДАРЬЯ ВЛАДИСЛАВОВНА

Роль некодирующих РНК в активности генов при действии радиации в нормальных и злокачественных клетках *in vivo* и *in vitro*

1.5.1 – радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Д.м.н., профессор, Засухина Галина Дмитриевна

Научный консультант:

К.б.н., Михайлов Владимир Федорович

Москва - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 10

1.1. Различия в чувствительности нормальных и злокачественных клеток к действию радиации в малой и высокой дозе по критерию активности генов и некодирующих РНК 10

1.1.1 Повреждение и репарация ДНК 11

1.1.2. Понятие радиочувствительности клеток 14

1.1.3. Влияние МДР и ВДР на функционирование клеток 15

1.1.4. Сигнальные пути клеточного ответа на действие радиации 17

1.1.4.1. P53 – страж стабильности генома: восстановление и клеточная смерть ... 18

1.1.4.2. Внутренний (митохондриальный) апоптотический путь 20

1.1.4.3. Внешний (рецепторный) апоптотический путь 21

1.1.4.4. Ингибиторы апоптоза IAP1 и IAP2 22

1.1.4.5. NFkB- сигнальный ответ 22

1.2. Изменение активности генов и их регуляторов в ответ на действие радиации... 27

1.3. Некодирующие РНК как возможные показатели прогноза онкозаболеваний и мишени для терапии 33

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 38

2.1. Реактивы и препараты 38

2.2. Оборудование 39

2.3. Объекты исследований 39

2.3.1. Биоптаты опухолей человека 39

2.3.2. Контрольная группа пациентов 41

2.3.3. Клеточные культуры 42

2.3.4. Лабораторные животные 42

2.4. Методы исследования 42

2.4.1. Культура клеточной линии Jurkat и лимфоцитов человека 42

2.4.1.1. Выделение и условия культивирования лимфоцитов крови человека 42

2.4.1.2. Облучение нормальных лимфоцитов и клеток Jurkat 43

2.4.1.3. Определение жизнеспособности клеток 43

2.4.2. Культура легочной карциномы мышей 44

2.4.2.1. Получение опухолевой суспензии 44

2.4.2.2. Трансплантация карциномы легких Льюиса 44

2.4.2.3. Определение параметров опухолевого роста 44

2.4.2.4. Облучение мышей в малой дозе (75 мГр) 45

2.4.2.5. Пролонгированное облучение мышей 46

2.4.2.6. Получение биологического материала мышей 47

2.4.3. Получение гомогената органов и тканей 47

2.4.4. Выделение нуклеиновых кислот 47

2.4.5. Измерение концентрации РНК 48

2.4.6. Обратная транскрипция для мРНК генов, днРНК и микроРНК мышей и человека ... 49
2.4.7. Обратная транскрипция для зрелых микроРНК ... 49
2.4.8. Подбор праймеров для целевых генов для постановки ПЦР-РВ ... 50
2.4.9. Анализ полученных данных ... 51
2.4.10. Статистическая обработка результатов ... 52

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ... 54

3.1. Изучение генов, регулируемых некодирующими РНК, при развитии ПРГ, как возможных показателей прогноза заболеваний ... 54
3.1.1. Исследование активности генов, днРНК и микроРНК при развитии ПРГ *in vitro* ... 54
3.1.2. Индивидуальные различия в активности мРНК генов, днРНК и микроРНК у больных с ПРГ ... 60

3.2. Различия в активности генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека при действии малых и высоких доз радиации ... 63
3.2.1. Выживаемость клеток ... 63
3.2.2. Влияние малых доз ионизирующей радиации на активность генов *P53* и *NFkB* в клетках ... 65
3.2.3. Влияние малой дозы на изменения активности генов *P53* и *NFkB* в клетках через 20 часов после облучения в дозе 5 Гр ... 69

3.3 Активность генов и некодирующих РНК в динамике формирования опухолей после облучения мышей ... 75
3.3.1. Роль некодирующих РНК - регуляторов генной активности в ответе на радиационное воздействие в малых дозах у мышей, инокулированных карциномой Льюиса ... 75
3.3.1.1. Влияние МДР на динамику формирования опухолей у мышей, инокулированных карциномой Льюиса ... 75
3.3.1.2. Динамика изменения активности генов и некодирующих РНК у мышей с трансплантированной карциномой Льюиса ... 78
3.3.2. Оценка активности генов и некодирующих РНК в процессе опухолеобразования при пролонгированном облучении мышей ... 89

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... 98

ВЫВОДЫ ... 101

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ... 103

СПИСОК ТЕРМИНОВ ... 104

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ... 105

ПРИЛОЖЕНИЕ ... 118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень разработанности темы. Открытие некодирующих РНК (микроРНК, малых интерферирующих, длинных некодирующих РНК (днРНК) и др.) как регуляторов генной активности в клетках человека и животных стимулировали изучение роли этих структур в ответ на действие радиации. При этом при изучении воздействия радиации на клетки одни исследователи акцентировали внимание на экспрессии генов или микроРНК, в то время как другие – на днРНК [1, 2].

Динамика уровней активности генных структур при облучении разными дозами радиации могут служить ранними показателями опухолеобразования, прогностическими признаками течения патологического процесса, развития радиочувствительности.

Часто неодинаково оценивалась вовлеченность разных генетических структур в ответ на действие радиации, неодинаково интерпретировались различия в радиочувствительности различных органов и тканей, что затрудняет использование генетических показателей в качестве биомаркеров прогноза течения патологического процесса.

Это объяснимо различиями в чувствительности определенных линий животных (мыши линии BALB/c, C57Bl/6 и др.) и их органов к разнообразным видам облучения, применение неодинаковых методов для оценки ответа клеток органов на действие радиации в зависимости от стадии опухолеобразования и ряда других факторов [3].

В последние годы особое внимание уделяется использованию малых доз радиации (МДР) в терапии разных патологий человека, начиная от воспалительных процессов до опухолеобразования [4, 5]. Этот феномен объясняется одним из проявлений гормезиса, когда МДР создают устойчивость к действию высоких доз радиации (ВДР) и ряду химических мутагенов в нормальных клетках, не оказывая влияния на опухолевые клетки. МДР обладают стимулирующим эффектом воздействия на разные показатели жизнедеятельности организма, в том числе активация иммунного статуса. Имеются отдельные публикации о вовлеченности некоторых генетических структур при воздействии МДР, например, при опухолеобразовании. Однако, остается неясным, какие генетические структуры являются ведущими и могут служить как прогностическими маркерами патологического процесса, так и мишенями для специфической терапии [6].

В связи с вышеизложенным необходимым является изучение комплекса генетических структур (генов и их регуляторов - некодирующих РНК), функции которых могут иметь существенное значение в ответе клетки на действие облучения, как при МДР, так и при ВДР в нормальных и злокачественных клетках. Принципиальная разница в ответе нормальных и злокачественных клеток на действие МДР позволяет изучить новый подход к показателям жизнедеятельности организма: МДР усиливают иммунный статус и активирует структуры, контролирующие клеточный гомеостаз к стрессовым воздействиям, являющиеся источником различных патологий человека, в частности, опухолеобразования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение комплекса генетических структур (генов и их регуляторов - некодирующих РНК), функции которых могут иметь существенное значение в ответе клетки на действие облучения, как при действии МДР, так и при действии ВДР в нормальных и злокачественных клетках.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ уровня экспрессии генов и их регуляторов - днРНК и микроРНК, при действии малой и высокой дозы в нормальных и злокачественных клетках человека с целью определения наиболее чувствительных генетических структур, которые могут быть использованы как показатели развития патологического процесса, в частности, опухолеобразования.
2. На основе определения уровней экспрессии генов и некодирующих РНК найти ранние прогностические показатели динамики радиоиндуцированного опухолеобразования у мышей, используя комплекс показателей активности генов и их регуляторов (некодирующие РНК).
3. Исследовать влияние МДР (до 0,1 Гр) на процессы опухолеобразования у мышей, инокулированных опухолевыми клетками, и выявить наиболее чувствительные органы по показателям уровней активности генов и некодирующих РНК в динамике.
4. Установить различия между нормальными и злокачественными клетками *in vivo* и *in vitro* при воздействии в малой и высокой дозе по показателям выживаемости клеток, уровней активности генов-супрессоров и онкогенов с целью определения генных структур, обеспечивающих стабилизацию жизнедеятельности нормальных клеток при дальнейшем облучении ВДР при радиотерапии.

Научная новизна

1. Впервые показаны различия роли генов и некодирующих РНК (микроРНК и днРНК) в нормальных и злокачественных клетках *in vivo* и *in vitro*, в процессе радиоиндуцированного опухолеобразования, что позволяет использовать их в качестве ранних показателей патологии и возможных мишеней для терапии.
2. Выявлены различия в радиочувствительности нормальных и злокачественных клеток человека линии Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия) *in vitro* к действию МДР, которая выражалась в повышенной устойчивости нормальных клеток, предварительно облученных в малой дозе, перед облучением в высокой. Впервые показана активация ряда генов-супрессоров и ингибирование некоторых онкогенов (гены, днРНК и микроРНК) в нормальных клетках.
3. Анализ генов и некодирующих РНК в клетках мышей разных органов при пролонгированном облучении (12,6 Гр в течение 21 часа) выявил особенности их активности в динамике и позволил выделить ранние прогностические маркеры до периода опухолеобразования.
4. Была обнаружена тенденция к снижению опухолеобразования у мышей линии C57Bl/6 с предварительно трансплантированными в заднюю лапу опухолевыми клетками, которые подвергались 4х-кратному облучению в МДР (75 мГр) на 10, 13, 17, 21 сутки после трансплантации. При этом в клетках костного мозга, тимуса и селезенки у инокулированных животных наблюдали активацию генов-супрессоров и ингибирование ряда онкогенов.
5. Обнаружение устойчивости нормальных клеток человека, облученных в МДР перед облучением в ВДР, в отличие от злокачественных клеток позволяет рекомендовать этот подход для преклинических исследований при радиотерапии, что позволит сохранять нормальную, окружающую опухоль ткань.

Положения, выносимые на защиту

1. Определена дифференциация генетических структур (гены и их регуляторы – некодирующие РНК) в нормальных и опухолевых клетках человека *in vitro* при действии МДР, создающих устойчивость к действию ВДР (гормезис). Исследованные гены могут расцениваться как гены-кандидаты горметического эффекта.

2. Уровни экспрессии генов и некодирующих РНК в клетках некоторых органов (костный мозг, селезенка, тимус, печень) мышей после пролонгированного облучения позволили использовать эти данные как ранние показатели радиоиндуцированного онкогенеза.
3. Четырехкратное воздействие МДР на мышей с инокулированными опухолевыми клетками (карцинома легких Льюиса) выявило тенденцию к снижению объема развивающихся опухолей (по сравнению с группой необлученных мышей) и корреляцию этого процесса со стимуляцией генов-супрессоров и снижением активности онкогенов в нормальных тканях.

Методология и методы исследования

В основе теоретической и методологической части диссертационной работы лежат работы, основанные на опыте отечественных и зарубежных ученых в области различных научных сфер: радиобиологии, молекулярной и клеточной биологии, генетики и биофизики. Материалы научных конференций, труды в рецензируемых изданиях и научных сборниках, объекты интеллектуальной собственности, публикации в научных сборниках по исследуемой проблеме составляют информационную базу. При проведении исследований были использованы:

- методы культивирования нормальных лимфоцитов и клеток линии Jurkat;
- облучение клеток и экспериментальных животных на рентгеновской установке;
- облучение экспериментальных животных на гамма - установке;
- молекулярные методы выделения РНК тризольным методом;
- метод обратной транскрипции для получения кДНК;
- амплификация методом ПЦР-РВ;
- статистические методы обработки полученных данных.

Теоретическая и практическая значимость

Применение действия МДР в системах *in vivo* и *in vitro* может позволить определить ряд положительных эффектов, связанных со стабилизацией здоровых клеток при применении действия ВДР. Такой подход может быть эффективным для защиты нормальных клеток, окружающих опухоль при радиотерапии.

Изучение и идентификация патологических путей, в которых задействованы гены и некодирующие РНК, в ответ на действие радиации в малой и высокой дозе в

нормальных и злокачественных клетках могут представлять практическую значимость для разработки панели биомаркеров как ранних показателей радиоиндуцированного опухолеобразования.

Апробация работы

Апробация результатов на научной конференции в Дубне «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (9-11 ноября 2016 г.)», Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2017г., 2018г.), Международной конференции академика АН СССР Д.К. Беляева (Новосибирск, 2017 г.), на 23 съезде физиологического общества им.Н.И.Павлова (Воронеж, 2017г.), 3й Российской конференция с международным участием «Радиобиологические основы лучевой терапии» (Дубна, 2019), VII съезде вавиловского общества генетиков и селекционеров (СПБГУ, 2019), Школе-конференции молодых ученых и специалистов "Ильинские чтения 2020" (Москва, 2020г.).

Достоверность результатов работы

Все научные положения и выводы сформулированы на основе обобщения экспериментального материала. Достоверность результатов работы определяется неоднократным повторением экспериментов, основанных на общеизвестных методах работы, подтвержающиеся в ходе статистического анализа полученных данных с заданной вероятностью, и кроме того, с помощью сравнения с данными, представленными другими исследователями.

Публикации

Опубликовано 13 работ по результатам диссертационного исследования, рекомендованных ВАК, в том числе 1 работа, рецензируемая в базе Scopus. Кроме того, результаты представлены в виде докладов на конференциях, включая международные. Разработан 1 стандарт организации.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 127 страницах. Основными разделами являются введение, обзор литературы, главы материалы и методы и четыре главы собственных результатов и обсуждений, а также заключение, выводы, список

литературы и приложение. Работа содержит 7 таблиц, 31 рисунок. Список литературы содержит 206 источников, из них 21 отечественных и 185 зарубежных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Различия в чувствительности нормальных и злокачественных клеток к действию радиации в малой и высокой дозе по критерию активности генов и некодирующих РНК

Бурное развитие атомной энергетики значительно сказывается на различных сферах жизнедеятельности человека. Большое внимание ученых уделяется эффектам радиационного воздействия на жизнь и здоровье людей. Трагические события, связанные с ядерными взрывами в Японии (Хиросима и Нагасаки) и на Украине (Чернобыль) породили у общества страх перед атомной энергией и источниками ионизирующего излучения (ИИ). Негативные последствия радиационных аварий развили общее мнение о негативном влиянии радиации на организм человека, прежде всего, с точки зрения способности индуцировать развитие злокачественных новообразований.

Однако со временем, расширяется сфера использования ИИ в различных сферах: атомной энергетике, промышленности, национальной безопасности, медицине и научных исследованиях, что приводит к большей вовлеченности людей в контакт с источниками ИИ, увеличивая потенциал воздействия на организм. Все это сводится к необходимости изучения действия различных эффектов ИИ [7].

Острые побочные эффекты действия высоких доз радиации (ВДР) были обнаружены еще в 19 веке, когда один из ученых, применяющих Х-лучи, получил дерматит собственных рук [8]. Однако, про малые дозы радиации (МДР) было известно ззначительно меньше. В соответствии с принятой классификацией доз радиации на 2015 год, МДР относятся к диапазону (<10-100 мГр), а ВДР - (1-10 Гр). Неоднократно отмечено, что ВДР могут быть вредны для организма, в то время как МДР – оказывают благоприятные эффекты [9].

Исследования, основанные на применении ВДР, при лечении онкологических пациентов показали, что такое излучение обладает иммуносупрессивными свойствами на организм, и эта парадигма преобладала в течение десятилетий [10].

Канцерогенные эффекты ИИ – это поздние эффекты, возникающие с вероятностью, зависящей от дозы облучения. Риск развития онкологических заболеваний при низких дозах радиации стал важным компонентом радиационной защиты и привлек внимание общественности к безопасности в связи с обширным

применением ИИ в медицинских и энергетических целях, вплоть до освоения человеком космоса. Очевидно, что большое число радиологических исследований осуществляются с применением ВДР, что повышает риск развития онкологических заболеваний, в то время как ситуация с применением низких доз гораздо менее ясна [11].

Согласно Международной комиссии по радиологической безопасности уровень развития онкологических заболеваний пропорционален дозе облучения [12]. За последнее время накоплены многочисленные данные о действии МДР. Большую роль играет способность тканей к репарации индуцированных повреждений. Показаны различия в ответе клеточной иммунной системы на радиацию, которая стимулируется при действии МДР и подавляется при действии ВДР [13]. ДНК репарация активировалась после действия МДР, хотя после ВДР, наоборот, ингибировалась [14].

В то же время эффекты МДР, такие как адаптивный ответ (АО), эффект свидетеля (ЭС) и геномная нестабильность не соотносятся с понятием о беспороговой линейной модели, подразумевающей предел дозы, выше которой увеличивается риск развития онкологических заболеваний [15, 16].

Концепция АО относится к тому факту, что предварительное воздействие в МДР может повысить клеточную толерантность к последующему облучению в ВДР, поскольку МДР создают устойчивость нормальных клеток, окружающих опухоль, к действию ВДР и активирует иммунные процессы [17-19].

Предполагалось, что риск развития повреждений будет иметь линейную зависимость от дозы облучения. Эта гипотеза оказалась дискуссионной, поскольку эксперименты свидетельствуют о неоднозначных результатах. Так, низкие дозы радиации представляют меньший, прогнозируемый риск в отличие от облучения в ВДР [18].

1.1.1 Повреждение и репарация ДНК

ИИ может непосредственно вызывать прямые повреждения ДНК, индуцируя однонитевые (ОНР) и двунитевые разрывы (ДНР), или опосредованно, чаще всего через образование активных форм кислорода (АФК) [20].

Исследования Кузина А.М. и его сотрудников, много лет работающих с облученными объектами, показали, что в клетках и тканях животных и растений под влиянием облучения накапливаются активные продукты (в частности, продукты

окисления фенолов – хиноны и их производные), выполняющие роль радиотоксинов. На основе этих исследований была сформулирована структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии [21].

Так, ИИ взаимодействует с атомами и молекулами в клетке, что приводит к повреждению ДНК, которые увеличивают риск возникновения рака. ОНР, ДНР, образование комплексов ДНК-ДНК и ДНК-белок индуцируются под влиянием облучения. Эти молекулярные изменения приводят к геномной нестабильности, которая выражается в образовании хромосомных аберраций, формированию микроядер и изменению экспрессии генов [22].

В клетках млекопитающих развита система репарации, направленная на исправление разрывов в ДНК, вызванные действием внешних факторов, в частности, ИИ. Такие повреждения ДНК могут репарироваться с помощью системы гомологичной (ГР) и негомологичной рекомбинации (НР) [23]. НР превалирует в G1 и ранней S фазе, и хотя является преобладающим механизмом при репарации ДНР ДНК, ГР имеет решающее значение в клеточной сигнализации и также регулируется клеточным циклом в S и G2 стадиях [24].

Однако, несмотря на репарационные процессы, часть клеток погибает. Радиация может провоцировать клеточную гибель двумя механизмами – апоптоз и некроз. Некроз — это пассивный процесс, в результате которого клетка проходит через митоз без процессов репарации ДНК, что приводит к накоплению хромосомных аберраций (микроядра) в дочерних клетках [25]. Некротические клетки характеризуются потерей целостности мембран, набуханием клеток, образованием апоптотических пузырьков и последующей случайной деградацией ДНК (рис. 1) [26]. В противоположность некрозу существует другой процесс — апоптоз, характеризующийся запрограммированной клеточной гибелью за счет каскада событий, провоцируемых воздействием стресса (радиация). Апоптоз характеризуется ядерной фрагментацией ДНК и конденсированием хроматина [27].

Рис. 1. Отличие гибели клетки при некрозе и апоптозе (адапт. из работы[28]).

Вышеупомянутые показатели широко изучались на клетках, подвергающихся облучения в ВДР, однако последствия воздействия МДР в настоящее время до сих пор остаются неясными [29].

В работе по изучению повреждений ДНК после ИИ в ряде случаев было показано отсутствие репарации после формирования ДНР, что, как предполагается, могло быть связано с проявлением защитного биологического механизма для снижения канцерогенного риска. По мнению авторов, такая концепция применима к ситуациям, когда лишь небольшая часть клеток имеет повреждения генетического аппарата [30].

Кроме того, реакцию клеток на действие ВДР нельзя экстраполировать на события, связанные с влиянием МДР, поскольку реакция клеток на действие разных доз ИИ различна [19].

Явление гормезиса при действии радиации на живые клетки является критерием для определения МДР. По выражению Кузина А.М.: «Малыми дозами по избранному критерию конечного радиологического эффекта для данного вида живых организмов следует считать те дозы (мощности облучения), при которых проявляется эффект, диаметрально противоположный наблюдаемому при действии ВДР» [31].

Важность вопросов действия МДР и ВДР на клетки и организм, и применение ИИ возрастает в связи с широким использованием медицинских процедур, таких как компьютерная томография (КТ), которая может дать более чем среднюю годовую суммарную дозу при одном облучении (10-100 мЗв) [32].

1.1.2. Понятие радиочувствительности клеток

Нормальные и злокачественные клетки по-разному реагируют на действие ИИ. Этот феномен определяется их радиочувствительностью (степенью восприимчивости к излучению), которая меняется по мере прохождения клетками жизненного цикла. Клетки наиболее радиорезистентны в стадии G0, ранней G1 и поздней S-фазе клеточного цикла, поскольку хроматин находится в деконденсированном состоянии. Это снижает количество возможных мишеней при воздействии ИИ. И наиболее радиочувствительны в поздней G1, G2 и в стадии митоза (M) [33].

Считается, что задержки в G2-фазе клеточного цикла дают клетке дополнительное время для активации ключевых белков, необходимых для репарации ДНК. Последние данные свидетельствуют о том, что клетки человека обладают способностью сшивать разрывы цепей в ДНК и повреждения в мембранах в результате одновременной активации генов и белков, которые, в свою очередь, контролируют клеточные реакции, как апоптоз и прогрессирование клеточного цикла. Такие механизмы сцепления позволяют клетке одновременно регулировать клеточный цикл и репарацию ДНК [34].

Поскольку опухолевые клетки высокоактивные и быстро пролиферируют, они должны быть более радиочувствительны к действию ИИ по сравнению с нормальными. Однако на радиочувствительность опухолевых клеток также влияет присутствие гипоксических и аноксических клеток. Большая часть исследованных опухолей человека содержит фракцию гипоксических клеток, которые выживают после облучения, поскольку они относительно резистентны к действию ИИ за счет кислородного эффекта [35].

Радиационная стойкость в S-фазе обусловлена повышенным количеством ДНК - синтетаз и ферментов репарации ДНК, а также повышением внутриклеточного уровня глутатиона (поглотителя свободных радикалов). Считается, что блокирование клеточного цикла в G1 фазе после ИИ позволяет клетке запустить процессы распознавания повреждений ДНК и активировать ее репарацию [36].

Скорость, с которой накапливаются повреждения ДНК после действия ИИ, также играет роль в радиационной устойчивости и чувствительности. Когда клетки подвергаются воздействию ИИ с низкой мощностью дозы (10-1000 мГр/ч), большинство человеческих клеток способны восстанавливать повреждения и поддерживать

целостность генома. При мощности дозы, превышающей 1000 мГр/ч, скорость нарастания повреждений ДНК быстрее, чем способность клетки восстанавливать повреждение, и имеет значительные летальные последствия. Также отмечается, что эффекты клеточного цикла зависят от мощности дозы и продолжительности воздействия ИИ [34].

1.1.3. Влияние МДР и ВДР на функционирование клеток

В ряде работ было проанализировано различие в ответе клеток и тканей на действие МДР и ВДР. В экспериментах показано, что биологический эффект малых доз зависит как от типа клеток и тканей, так и от вида животных. В 1984г. Olivieri et al. задокументировали, что культивируемые лимфоциты могут приобретать устойчивость к хромосомным аберрациям, индуцированным вследствие действия ВДР, при их предварительном облучении МДР, что приводит к формированию АО. Кроме того отмечено, что действие МДР может по-разному сказываться на различных системах жизнедеятельности клеток, в том числе при развитии онкозаболеваний [37, 38]. За последние несколько десятилений биологические эффекты МДР, такие как гормезис, ЭФ и АО стали в центре внимания [38, 39]. Исследования разных авторов показали, что при формировании АО после действия излучения в малой дозе изменяется экспрессия генов, участвующих в пролиферативных процессах, инактивации АФК и репарации повреждений ДНК [40-42]. Анализ экспрессии генов показал, что механизмы, задействованные в процессы регуляции транскрипции, больше всего нарушаются под влиянием МДР, в то время как функции клеточного цикла и пролиферации доминируют на ранней стадии ответа на воздействие в высокой дозе. В частности, процессы клеточной пролиферации и дифференциации, а также экспрессия генов продолжалась до 16 часов при облучении в ВДР, и до 24 часов при воздействии МДР. Эти процессы связаны с перестройкой функционирования клетки, направленные на ее восстановление при воздействии МДР, или на дальнейшее повреждение при действии ВДР [43].

С другой стороны, в исследовании на эпидермальных клетках человека показано, что ВДР вызывают экспрессию большего числа генов, чем МДР. Основной ответ был ассоциирован с выживаемостью и передачей сигналов между клетками, в то время как ВДР индуцировали продукцию генов, ответственных за клеточную смерть [44].

Наиболее измененными оказались гены, ответственные за апоптоз, протеолиз, имеющие место при действии ИИ [45].

В эксперименте на мышах с трансплантированной карциномой Льюиса была выявлена активация антиопухолевого иммунитета и ингибирование опухолевой прогрессии в ответ на действие МДР, за счет индукции АО. Иммунный ответ был связан как с NK-клетками и Т-клеточной активацией, так и с увеличенной экспрессией CD69. Кроме того клеточная реакция проявлялась в увеличении продукции цитокинов (IFN-γ, IL-2) в спленоцитах [19]. Важной особенностью явился факт защитного действия МДР (75 мГр) перед последующим облучением в ВДР (1 Гр). Отмечалось, что предварительное облучение в МДР активировало репарационные механизмы клетки, антиоксидантную активность и модифицировало метаболизм глюкозы, что ингибировало опухолевый рост и создавало благоприятные условия для выживаемости нормальных клеток, несмотря на последующее облучение в ВДР [19].

В периферической крови пациентов-доноров была показана активация цитокинов и хемокинов, а также генов, отвечающих за иммунные и воспалительные процессы в ответ на действие МДР (0,05 Гр). В то же время при влиянии ВДР (1 Гр) активировались процессы повреждения ДНК и апоптоза за счет индукции p53-системы [46].

Таким образом, МДР запускают иммунные реакции, тогда как ВДР изменяли работу клетки в сторону апоптотических процессов [47].

Исследование, проведенное на лимфобластных клетках человека, показало, что основным в активации при действии МДР выступает *P53* и его гены-мишени [48].

Анализ патологических путей, задействованных при влиянии МДР на клеточную модель кожи человека, показал, что активную роль принимали гены, ответственные за регуляцию клеточной пролиферации, одним из которых является *NFkB* [49].

Большая часть рассмотренных исследований основывалась на изучении действия опухолевого супрессора p53 и связанных с ним белков, реагирующих на повреждения ДНК, вызванные ИИ. P53- система играет важную роль в поддержании гомеостаза, подавлении опухолей, а также клеточных реакциях на действие ИИ [50].

Кроме того, в развитии радиорезистентности участвуют механизмы, связанные с активацией сигнальных путей (PI3K/AKT, NFkB), а также повышенная экспрессия микроРНК, усиливающая ДНК-повреждениях [51, 52].

Совокупность имеющихся в радиационной биологии данных убедительно доказала, что глобальные изменения в экспрессии генов являются одной из ключевых составляющих биологических реакций на ИИ. При этом эффекты МДР сильно отличаются от действия ВДР. Изменения экспрессии генов, а также другие процессы, вызванные ИИ, такие как ответ на повреждения ДНК, репарация ДНК, апоптоз, активация контрольных точек (checkpoints) клеточного цикла и трансформация клеток, могут отличаться как качественно, так и количественно после облучения в малой и высокой дозе радиации. Важно отметить, что большинство данных подтверждают этот вывод, делая гипотезу беспороговой линейной модели сомнительной в диапазоне действия малых доз [7].

Однако определение механизмов, лежащих в основе формирования радиационного АО, до сих пор далеки от понимания [53].

В то время как эффекты катастрофического воздействия ВДР на организм человека уже хорошо изучены, действие МДР остается дискуссионным. В последнее время появляется все больше литературных данных о положительном влиянии МДР (10-100 мГр) на иммунитет человека. Однако вопрос о биологической эффективности МДР до сих пор остается спорным [5, 54].

1.1.4. Сигнальные пути клеточного ответа на действие радиации

Ответ клетки на действие ИИ запускает каскад реакций, направленный на устранение повреждений, таких как ДНР ДНК и сохранения стабильности генома. В данном процессе участвует совокупность генов и их регуляторов, стремящихся активировать защитные системы, например, иммунный ответ, и остановить процессы гибели клетки. Хотя ИИ индуцирует спектр биологических ответов, его воздействие и лежащие в его основе молекулярные механизмы зависят от особенности клетки, а также дозы и мощности дозы [55]

Биологические эффекты при действии МДР имеют свои особенности и могут отличаться от тех, которые предсказываются беспороговой линейной моделью [55, 56].

Ряд исследований показал, что МДР могут защищать клетку от возникновения мутаций и активировать АО *in vivo* [19, 57]. Таким образом, клетки, подвергшиеся воздействию МДР, могут развить устойчивость к последующему повреждению ДНК и гибели клеток [58, 59].

1.1.4.1. P53 – страж стабильности генома: восстановление и клеточная смерть

Хотя опухолевый супрессор p53 был охарактеризован впервые более чем 25 лет назад [60], до сих пор остается еще много вопросов, касающихся механизмов его действия.

Полипептид p53 состоит из нескольких функциональных доменов, которые работают согласованно, в зависимости от контекста для достижения связывания ДНК и ее активации. Активность p53 регулируется MDM2, который способствует деградации p53 путем убиквитинирования [61]. Родственный белок MDM4 также блокирует активацию p53, хотя и не способствует его деградации. При многочисленных клеточных стимулах подавляющие эффекты MDM2 и MDM4 могут быть ослаблены различными сигнальными путями, которые предотвращают физическое взаимодействие между p53 и его репрессорами (рис. 2) [62].

P53 является ключевым белком, стимулируемым действием ИИ, который координирует работу ДНК - репарации с прогрессией клеточного цикла и другими функциями [36].

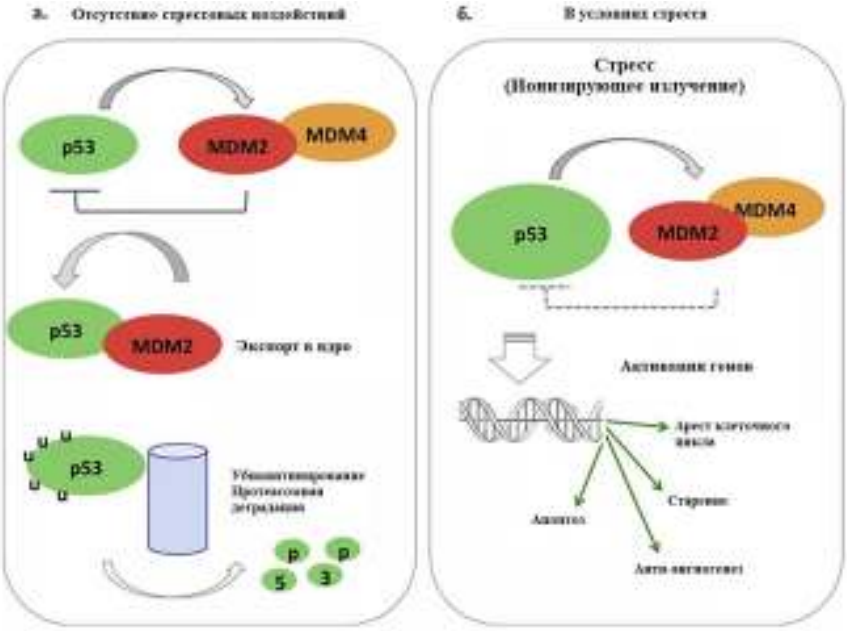


Рис 2. Взаимодействие p53 с MDM2 и MDM4 (адапт. из работы [63])

В ответ на действие ИИ в первую очередь активируются два патологических пути: ATM и ATR, которые являются инициирующими киназами, фосфорилирующие и активирующие различные нижестоящие белки [64].

Остановка клеточного цикла является важным процессом при действии повреждающих факторов, способствующих репарации ДНК и поддержанию стабильности генома. Регуляторы таких процессов активируются за счет фосфорилирования ATM и ATR (рис.3). Опухолевый супрессор белок p53 является центральным звеном при ответе ДНК на повреждения под влиянием ATM, который фосфорилирует p53 и приводит к его стабилизации за счет диссоциации от MDM2 и аккумулированию в ядре, где он работает как транскрипционный фактор (ТФ) [65].

В условиях нормального функционирования клетки, p53 постоянно экспрессируется, но подвергается протеосомальной деградации из-за E3 убиквитин - лигазы и MDM2 [66]. Стойкие повреждения ДНК приводят к накоплению и усилению активации p53. Кроме того, решение об аресте клеточного цикла или апоптозе определяется различным спектром генов, находящихся под влиянием гена *P53*.

Из рис. 3 видно, как после воздействия ИИ на клетку во время физико-химической стадии образуются гидроксил - радикалы, повреждающие целостность ДНК, вследствие формирования ДНР.

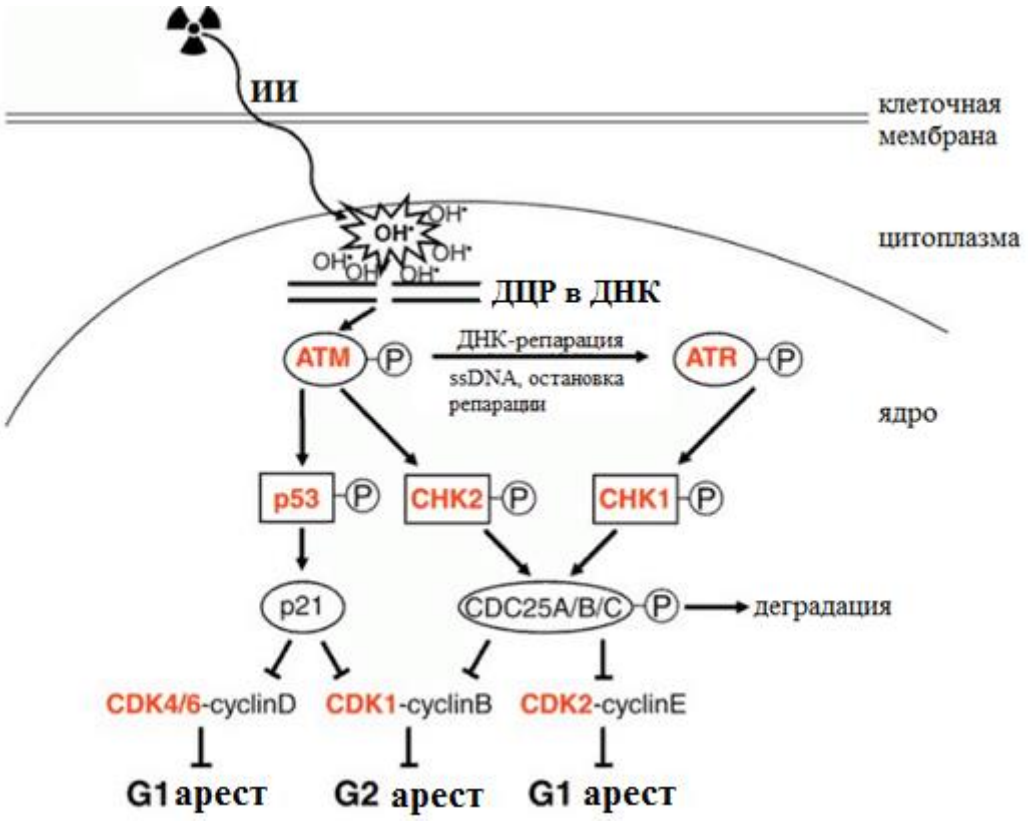


Рис 3. Активация ареста клеточного цикла после воздействия радиации (адапт. из работы [67])

В результате чего активируется ATM-киназа и p53. Последний в свою очередь стимулирует экспрессию циклин-зависимой киназы p21, что является причиной остановки клеточного цикла в G1 и G2 стадиях [68].

Высокий уровень базальной активности AKT был обнаружен в опухолевых клетках и не отмечался в нормальных, что создавало радиорезистентность злокачественных клеток [69].

В целом, активация AKT опосредует различные биологические эффекты, в том числе метаболизм, рост, пролиферацию, выживаемость, синтез белков и апоптоз [70, 71].

Излучение инициирует в основном внутренний апоптотическстий путь. Но в зависимости от дозы ИИ и типа клеток возможен внешний путь активации апоптоза.

1.1.4.2. Внутренний (митохондриальный) апоптотический путь

Активация внутреннего апоптотического пути при ОНР и ДНР повреждениях ДНК происходит, когда репарационные процессы не удовлетворительны. Продолжительная активация p53 – ключевой фактор ответа ДНК на повреждения, однако эти дефекты могут привести к апоптозу клеток [72].

Накопление p53 в ядре клетки провоцирует экспрессию проапоптотических генов *BCL2* и *BAX*, которые вызывают гибель клеток путем увеличения проницаемости внешней митохондриальной мембраны и последующего высвобождения цитохрома *c* [73].

ИИ может непосредственно усиливать продукцию АФК в клетке, вызывая высвобождение Ca^{2+} из митохондрий и провоцируя высвобождение проапоптотических митохондриальных белков [74].

Высвобождение цитохрома *c* в цитозоль приводит к активации каспаз, ингибирующих процессы репарации ДНК, и, как следствие, к запуску ДНК-деградации и апоптозу клетки (рис.4) [75].

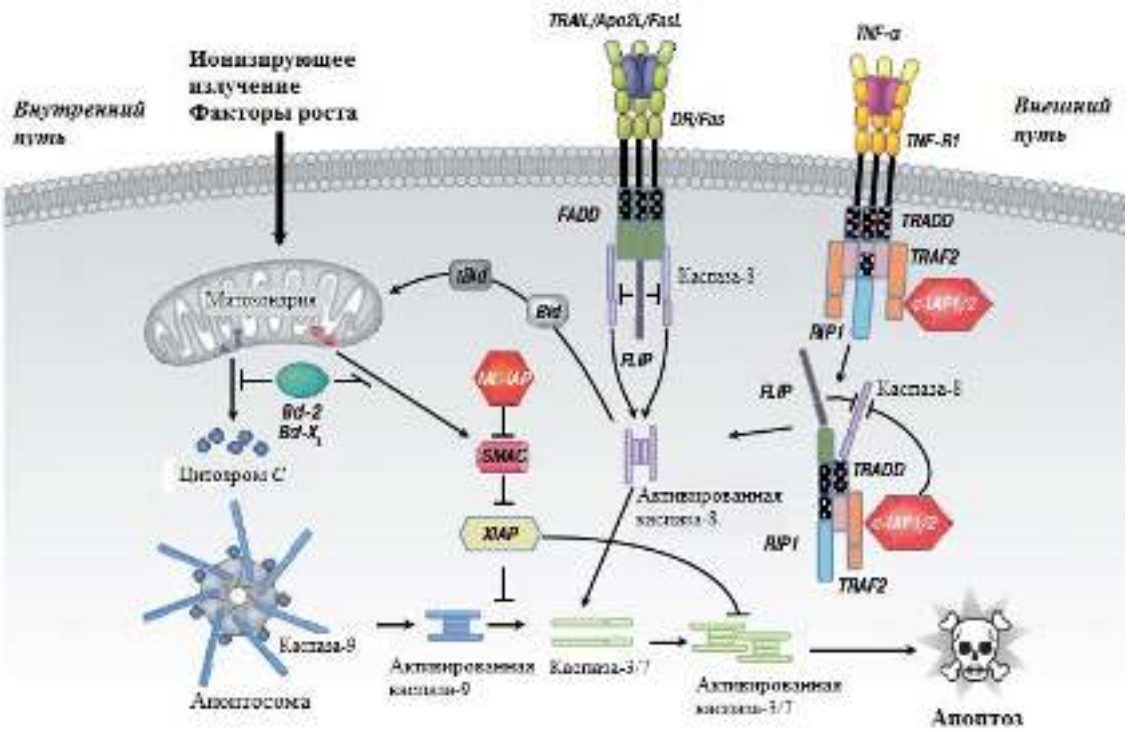


Рис.4. Внутренний и внешний пути апоптоза (адапт. из работы[72])

1.1.4.3. Внешний (рецепторный) апоптотический путь

Внешний путь опосредован рецепторами смерти, один из которых фактор некроза опухоли RTNF (receptor of tumor necrosis factor), через который осуществляется активация каспазы-8 и -10, стимулирующие активацию апоптотического пути (рис. 4) [76].

Ответ клеток на хроническое облучение малыми дозами имеет принципиальные отличия ответа на действие высоких доз. Реакция на действие МДР включает формирование АО, ЭС и высокую радиочувствительность, которые ослабляют последующее воздействие ВДР, что отражается в снижении образования мутаций, подавлении опухолевого роста и защиты от цитогенетических повреждений [38, 77]. Эти процессы также обусловлены, в том числе, ролью гена *P53* в этих событиях [78].

P53 является одним из основных активаторов ответа клетки на повреждения, вызванные ИИ, хотя не единственным. Не менее важные функции выполняет система NFkB. Однако механизм защиты несколько отличается от такового при активации p53. Индукция NFkB может защищать клетки от апоптоза путем прямой регуляции антиапоптотических генов [79].

1.1.4.4. Ингибиторы апоптоза IAP1 и IAP2

С системой NFkB тесно связаны ингибиторы апоптоза IAP1 и IAP2, которые участвуют в активации NFkB-патологического пути. IAP – семейство белков, которые вовлечены в процессы активации иммунитета, воспаления, клеточного цикла и клеточной смерти [80]. Клеточные белки IAP были впервые обнаружены как компоненты комплекса TNFR, которые активировались через взаимодействие с белками TRAF1 и TRAF2 [81]. c-IAP1 и c-IAP2 регулируют внешний апоптотический путь через убиквитин-лигазную активность [82]**.** Белки c-IAP регулируют стимуляцию каспаз через E3-лигазную активность и модуляцию TNF-опосредованной гибели клеток, а также, врожденный иммунитет и пути NFkB [83]**.** Гены *IAP* вовлечены в процессы канцерогенеза из-за их способности подавлять апоптоз, но также потому, что они активируют NFkB сигнальный путь, способствуя пролиферации опухолевых клеток.

1.1.4.5. NFkB- сигнальный ответ

Строение комплекса NFkB

У млекопитающих семейство NFkB состоит из пяти членов семейства Rel: RelA (также называемый p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (также называемый NFkB1) и p52/p100 (также называемый NFkB2). Показано, что гетеродимеры p50 и p65 являются наиболее распространенными формами NFkB [84]**.** При отсутствии внешних воздействий комплекс NFkB, представляющий собой в основном гетеродимер p50/p65, связывается с одним из своих ингибиторов (семейство IkB) [85]**.** Однако при воздействии внешних факторов этот комплекс может разрушиться, и NFkB транслоцируется в ядро, где активирует большое количество генов, участвующих в стрессовых реакциях, воспалении и апоптозе [86].

Канонический путь NFkB

Наиболее изученным стимулом в активации канонического пути является TNFα, который связывается со своим рецептором (TNFR1), что является триггером для инициации комплекса TRADD, состоящего из TRAF2, c-IAP1, c-IAP2 и RIP1. c-IAP1 и c-IAP2 связываются с рецепторами TNF с помощью TNFR2 (рис. 5) [87]**.** Лиганд-стимулированная агрегация рецепторных комплексов вызывает димеризацию c-IAP1

или c-IAP2, активацию активности E3-лигазы и последующего убиквитинирования киназы RIP1. Это приводит к фосфорилированию IkB и освобождению NFkB с его дальнейшей транслокацией в ядро, где осуществляется взаимодействие с другими ТФ, и, тем самым, регулируется транскрипция различных генов [87]. Кроме того, NFkB может регулировать транскрипцию своего собственного ингибитора IkBα, что указывает на контроль обратной связи в регуляции NFkB. Вновь синтезированный IkBα способен проникать в ядро и удалять NFkB из его ДНК-связывающих сайтов и транспортировать его обратно в цитоплазму, тем самым прекращая транскрипцию NFkB-зависимого гена [88]. Поэтому белки c-IAP следует рассматривать как положительные регуляторы активации канонического пути NFkB.

Неканонический путь активации NFkB

Неканоническая активация сигнального пути NFkB основана на регуляции ограниченного протеолиза незрелого предшественника NFKB2, p100 за счет фосфорилирования последнего вследствие активации ингибиторов апоптоза. По такому пути активируется, главным образом, димер p52/RelB [89].

В отличие от бурной и скоротечной активации канонических факторов NFkB пути, активации неканонических факторов, как правило, медленная и постоянная. Типичными индукторами неканонического пути NFkB являются лиганды суперсемейства TNFR [90].

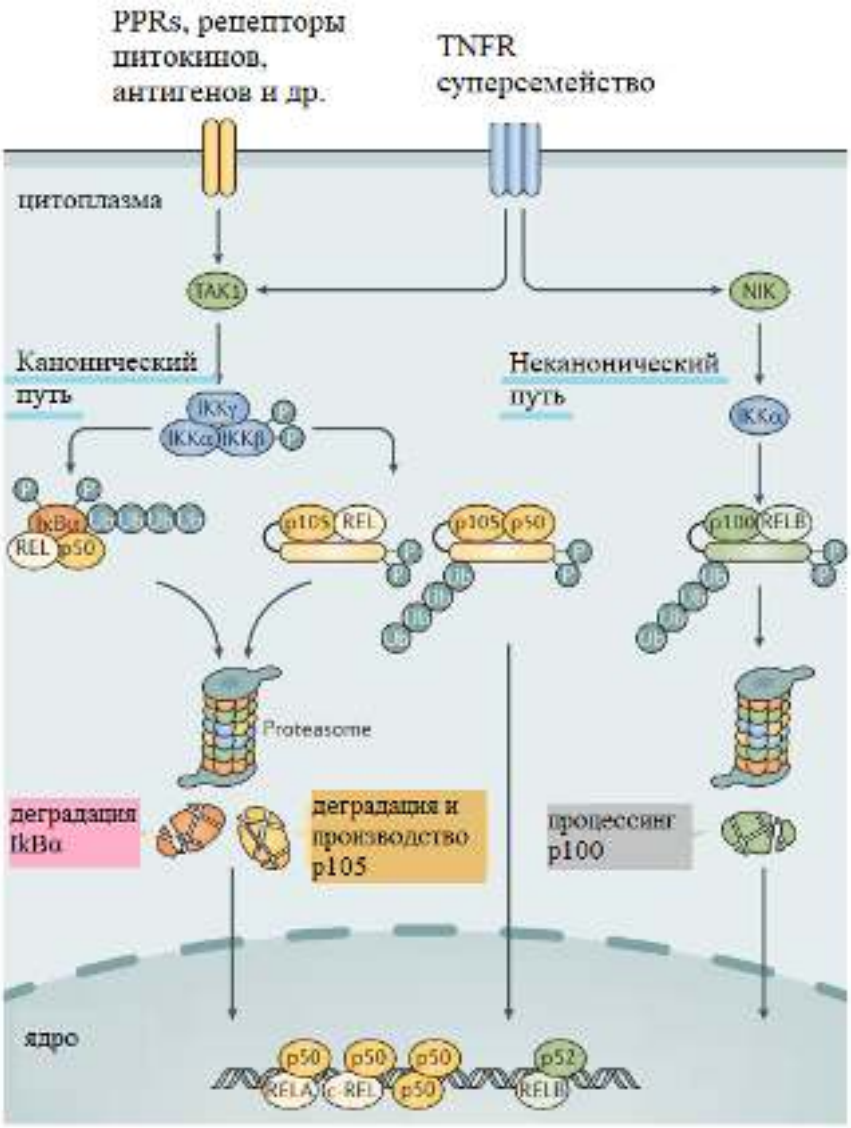


Рис.5. Канонический и неканонический NFkB пути (адапт. из работы [90])

Таким образом, активация NFkB, индуцированная действием ИИ, может быть вовлечена в остановку клеточного цикла и предотвращение апоптоза, чтобы позволить клеткам восстановить поврежденную ДНК [90]**.** Сайт связывания NFkB был идентифицирован в промоторной области циклина D1 (CCND1) [91]. NFkB способен регулировать клеточный цикл посредством индукции белка G1/S циклина D1. Устойчивая активация NFkB может позволить клеткам с накопленным повреждением ДНК избежать апоптоза, а конститутивная активация NFkB, как было показано, предотвращает апоптоз раковых клеток [89].

Известно, что в ответ на облучение NFkB снижает гибель клеток, стимулируя экспрессию антиапоптотических генов и активацию клеточной системы антиоксидантной защиты. Известно, что конститутивная активация генов,

ассоциированных с NFkB, в опухолевых клетках повышает радиационную устойчивость, тогда как делеция у мышей приводит к гиперчувствительности к повреждению ЖКТ, индуцированному ИИ [92].

Активация NFkB через АКТ путь

Другой путь активации NFkB осуществляется через протеинкиназу АКТ (рис. 6). АКТ активируется в PI3K - сигнальном пути и приводит к клеточному росту, образованию белков теплового шока и делению клеток, в то же время АКТ предотвращает процессы апоптоза. Это осуществляется за счет фосфорилирования белка MDM2 и перевод его внутрь ядра с последующим блокированием активности p53. С другой стороны, киназа АКТ фосфорилирует белок IKK, что приводит к деградации комплекса NFkB-IkB, и транслокации NFkB в ядро. Свободный IKK фосфорилирует p53 и деградирует его. Таким образом, происходит снижение активности гена p53 и увеличение активности NFkB [93].

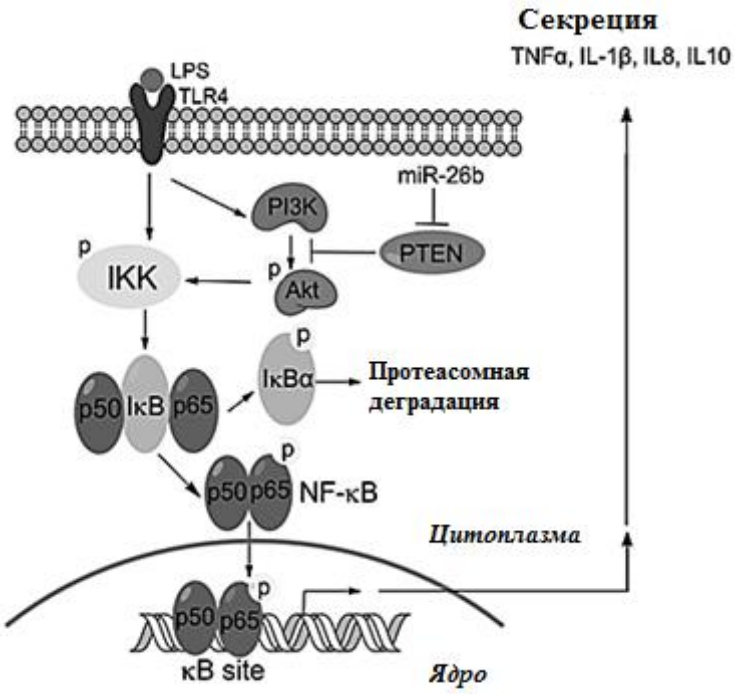


Рис.6. Активация NFkB через АКТ путь (адапт из работы [94])

В опытах на мышах было показано, что нокдаун p53 приводит к увеличению активности IKK и NFkB. Что доказывает роль гена *P53* в качестве супрессора *NFkB* [95]**.**

Таким образом, МДР могут способствовать низкому уровню ДНК-повреждений и аресту клеточного цикла, в то время как ВДР являются триггером к активации апоптоза.

Выбор между арестом клеточного цикла или апоптозом объясняется селективным выбором *P53* в активации генов – мишеней, таких как *P21* и *GADD45A*, являющихся регуляторами клеточного цикла, а также генов *BAX*, *FAS* или *PUMA*, представляющие членов основного апоптотического пути [47].

В работе Fei P показано, что клетки развили сложные защитные «устройства» для самосохранения при ДНК-повреждениях за счет специфических механизмов, направленных на детекцию дефектов и индукцию негативных регуляторов клеточного цикла. Однако эти механизмы основываются на контроле генов-мишеней под воздействием *P53* [47].

Клеточный ответ на действие ИИ, и в частности, МДР, осуществляется за счет генов, контролирующих патологические пути в клетке. В ответ на действие радиации активируются патологические пути (например, ATM, NFkB) а также ТФ, такие как P53, NFkB, GADD153 и AP1, активирующие действие своих мишеней [96].

Реакция клеток на стресс, вызванный ИИ, многостадийная и многокомпонентная и включает в себя изменение активности многих генов и их продуктов: днРНК и микроРНК, часть из которых будут рассмотрены в следующих главах.

1.2. Изменение активности генов и их регуляторов в ответ на действие радиации

После воздействия на организм ИИ активируются различные сигнальные пути, такие как MAPK, PI3K и ATM, и все эти процессы жестко регулируются в связи с изменениями экспрессии различных ТФ (AP, NFkB, P53, ARE, GADD153 и др.) наряду с изменениями функционального состояния клеточных органелл. Это может вызвать различия в экспрессии большого числа генов, которые в основном связаны с прогрессией клеточного цикла, выживанием клеток, репарацией ДНК и апоптозом [96].

Генотоксический стресс, в частности ИИ, индуцирует действие *P53*, как супрессора опухолей через активацию его генов-мишеней, вовлеченных в процессы апоптоза, арест клеточного цикла и старение. В целом, *P53* регулирует разнообразные биологические процессы, нарушение которых может приводить к формированию опухолей.

В первую очередь, тесную связь при взаимодействии с *P53* и *NFkB* имеют такие гены-мишени, как *PTEN, CTCF, TAL, CCND1, ORAOV1, iNOS, G-CSF*, днРНК NEAT1, MALAT1, DINO, PINT, ROR и различные микроРНК [39, 97].

Адекватный ответ клетки, связанный с восстановительными процессами, как реакция на образование АФК, имеет решающее значение для снижения повреждений от окислительных структур при действии ИИ на организм. Как результат – усиление экспрессии антиоксидантных и антиапоптотических белков [98].

Оксидативный стресс является главным источником повреждений, вызванных ИИ, и связан с активацией индуцибельной синтазы оксид азота (iNOS) (рис.7).

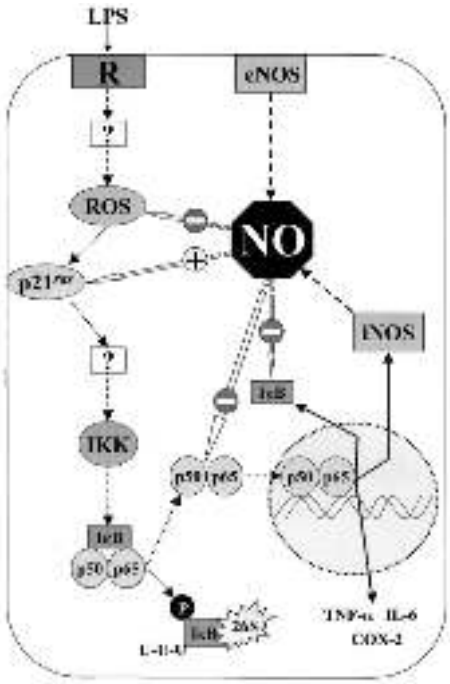


Рис. 7. Схема активации iNOS за счет NFkB (адапт из работы [99])

NFkB система активируется под воздействием TNFα, инициируемым влиянием ИИ, что приводит к связыванию *NFkB* с промоторной областью на *iNOS* и активации транскрипции последнего [100]**.**

В работе Singh V.K. et al. показано, что после облучения мышей активировался ген *G-CSF*, который благоприятно влияет на восстановление клеток после радиационного повреждения [101], поскольку приводит к индукции пролиферации и миграции эндотелиальных клеток. Однако некоторые исследования показывают, что активация *G-CSF* отмечается при различных опухолях, в частности при раке молочной железы [102], что указывает на различные его функции.

Семейство генов циклинов играет важную роль в регуляции клеточного цикла [103]. Белок циклин D1, который учавствует в прогрессии клеточного цикла, пролиферации и росте клеток за счет способности переводить клетки из G1 в S стадию клеточного цикла, образуется путем транскрипции гена *CCND1 (Cyclin D1)*. Показано, что гиперэкспрессия этого гена наблюдается в раковых клетках из-за многократного копирования в 11 хромосоме. Повышенная активность *CCND1* коррелирует с опухолевой прогрессией и метастазированием. Увеличение экспрессии гена *CCND1* является одним из прогностических факторов развития онкозаболевания. Подавление активности *CCND1* приводит к понижению пролиферации клеток, а также к подавлению активности некоторых генов, связанных с S-фазой и репарацией ДНК [104]**.**

Высокая экспрессия гена *CCNE2 (Cyclin E2)* наблюдается в различных типах рака (рак молочной железы, рак легких) и является показателем неблагоприятного исхода и фактором метастазирования [105].

Механизм действия *CCNE2* аналогичен *CCND1*, и заключается в запуске процесса перехода клетки из G1 фазы клеточного цикла и вступление в S-фазу (синтез ДНК) под воздействием внешних сигналов (например, ИИ). Так, на мышах показано, что в клетках карциномы молочной железы увеличивается экспрессия гена *CCNE2*. Возможно, это связано с тем, что онкоген *Myc*, экспрессия которого отмечена при карциномах, прямо или косвенно контролирует транскрипцию гена *CCNE2* [106].

Ряд факторов, вызывающих активацию транскрипции гена *P53* (радиация, токсические агенты), стимулируют транскрипцию гена *P21*, что в свою очередь запускает экспрессию днРНК и микроРНК, и влияет на снижение уровня гена *CCNE2*. Как следствие, задерживается переход клетки из G1 -фазы клеточного цикла в S-фазу (рис.8) [105].

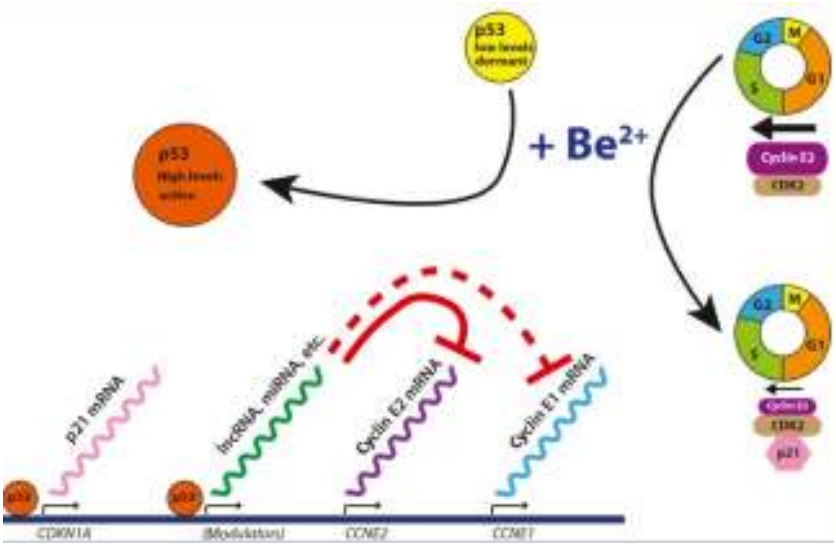


Рис. 8. Механизм p53-зависимого торможения G1/S перехода клеточного цикла. (адапт из работы [105])

Среди опухолевых супрессоров наряду с геном *P53* широко известен ген *PTEN*, который инактивируется в раковых клетках за счет мутаций, эпигенетических изменений или же после посттрансляционных модификаций. Белок PTEN выполняет важную роль в регуляции клеточного цикла, в процессах апоптоза, пролиферации, передачи сигналов и других клеточных процессах [107].

PTEN негативный регулятор PI3K-AKT-пути. В случае воздействия гена *PTEN* происходит торможение этого сигнального пути за счет дефосфорилирования PIP3, накопления PIP2 и, как следствие, снижения содержания PIP3 [108].

В свою очередь PTEN имеет тесную связь с P53 (рис.9). Первый механизм заключается в ингибировании PTEN активности MDM2, за счет инактивации AKT. Вследствие этого происходит транслокация MDM2 в клеточное ядро, где осуществляется убиквитинирование p53 и его протеосомная деградация. Второй путь активируется за счет повреждений ДНК, что приводит к накоплению белка p53 и активации транскрипции гена *PTEN*, который по механизму положительной обратной связи защищает *P53* от деградации [109].

В работе Feng X. et al. показано, что снижение активности PTEN также воздействует на NFkB патологический путь за счет активации p65 субъединицы и ее транслокации в ядро при увеличении содержания AKT (рис.6) [110]**.**

В работе по изучению влияния гена *PTEN* на клеточный цикл показано, что *PTEN* блокирует переход клетки G1-S и предотвращает неконтролируемую пролиферацию и хромосомную нестабильность, таким образом, защищая клетку от канцерогенеза [111].

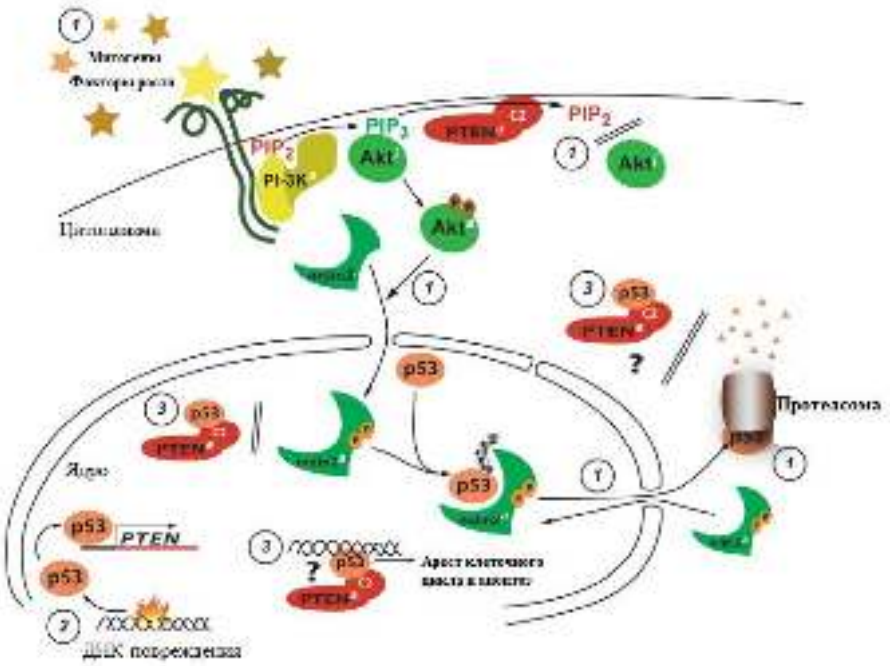


Рис.9. Внутриклеточные взаимодействия *PTEN* и *P53*
(адапт. из работы [109])

Геном млекопитающих транскрибируется с образованием тысяч днРНК. Было показано, что некоторые из этих днРНК рекрутируют регуляторные комплексы через

взаимодействия РНК-белок, что приводит к влиянию на экспрессию близлежащих генов. Это предположение навело на мысль о том, что днРНК также могут выступать в качестве местных регуляторов [112].

Определенные функции связаны с ТФ TAL1, экспрессия которого первоначально обнаружена в гемопоэтических клетках, контролирующих развитие ростков кроветворения [113]. В отличие от NFkB, который играет важную роль при канцерогенезе в В-клетках, опухолеобразование в Т-клетках чаще всего ассоциировано с онкопротеином TAL1, сверэкспрессия которого имеет неблагоприятный прогноз течения заболевания. Авторами было показано, что ТФ TAL1 связывается с промоторной областью гена *NFkB*, а именно с p50 субъединицей и блокирует его транскрипцию. При подавлении экспрессии гена *TAL1* в Т-клетках отмечается увеличение активности и синтеза гена *NFkB* [113].

CTCF известен как консервативный многовалентный ТФ, выполняющий множество функций в регуляции транскрипции и трехмерной организации генома за счет участия в формировании 3D-структур хроматина. Наличие мутаций или ингибирование экпрессии этого гена приводят нарушению стаабильности генома, что может сопровождаться онкотрансформацией [114]. После воздействия ИИ на клетку *CTCF* играет ключевую роль при блокировании образования фокусов γH2AX, для снижения их распространения и ограничения области ДНР ДНК [115]. Известно, что повышение уровня *CTCF* в клетках рака молочной железы отражает развитие опухолевого процесса. Основываясь на современных знаниях о соматических мутациях в гене *CTCF* при различных видах рака, а также об эффекте, ингибирующем рост в раковых клетках и моделях ксенотрансплантата, можно предположить роль *CTCF* в качестве гена-супрессора опухолей [116]. Парадоксально, однако, что уровни *CTCF* были обнаружены повышенными, а не сниженными во многих клеточных линиях рака молочной железы, а также в опухолях молочной железы. Считается, что избыточная экспрессия *CTCF* дает раковым клеткам селективное преимущество в выживании, защищая их от апоптоза посредством эпигенетической регуляции экспрессии гена *Bax*. Тем не менее, точный механизм *CTCF* и связанные с ним факторы все еще неясны [117]. Результаты работы Docquier et al. предлагают гипотезу о том, что активация *CTCF* может предохранять раковые клетки от апоптоза. Этот эффект, вероятно, отражает прямое и косвенное влияние белка CTCF на функцию проапоптотических (Bax) и

антиапоптотических белков (Bcl-2, Bcl-XL). Была выявлена взаимосвязь между CTCF с потенциальной мишенью Bax: экспрессия эндогенного Bax снижалась под воздействием повышенной активности CTCF, и наоборот, активность Bax активировалась при подавлении CTCF. Известно, что экспрессия Bax снижается при раке груди, хотя молекулярные механизмы этого явления до сих пор не ясны [117].

1.3. Некодирующие РНК как возможные показатели прогноза онкозаболеваний и мишени для терапии

Некодирующие РНК составляют значительную часть генома человека (98%). К ним относятся рибосомальные, малые ядерные, теломеразные, малые интерферирующие, длинные некодирующие и другие типы РНК. [118]**.** Долгое время некодирующие РНК считались «мусором», однако лишь недавно были определены их истинные функции в поддержании клеточного гомеостаза, регуляции генов, жизнедеятельности клеток, а также в развитии различных патологий, в частности, развития онкологических заболеваний. Особое внимание отводится изучению днРНК и микроРНК, играющих важную роль в процессе опухолеобразования [119, 120].

С момента открытия некодирующих РНК микроРНК привлекали больше внимания, чем днРНК, однако было установлено, что оба семейства играют важную роль в контроле экспрессии генов, либо в качестве посттранскрипционных регуляторов. Как микроРНК, так и днРНК могут регулировать ключевые гены, участвующие в развитии рака, влияя на рост, инвазию и метастазирование опухоли, увеличивая активацию онкогенных путей и ограничивая экспрессию опухолевых супрессоров [121].

Число зрелых микроРНК в клетке определяется тысячами [122], тогда как днРНК – десятками тысяч [123]. В связи с этим число и функции этих генетических единиц, связанных в том числе с регуляцией активности генов, еще мало изучена [124].

ДнРНК представляют собой длинные структуры, состоящие более чем из 200 нуклеотидов. Они регулируют процессы транскрипции, являются компонентами механизма синтеза белков. Влияют на развитие клеток, гаметогенез, иммунный и опухолевый рост [125]. Показано, что действия ИИ и при онкогенезе изменяется функционирование регуляторных РНК, участвующих в работе P53 и NFkB - систем [2, 126, 127].

МикроРНК представляют собой короткие РНК-транскрипты длиной 18-24 нуклеотида, которые регулируют экспрессию генов на трансляционном уровне. Они связываются с 3’- нетранслируемой областью мРНК и блокируют трансляцию и/или деградацию транскрипта, тем самым снижая скорость синтеза белка.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что микроРНК тканеспецифичны и ассоциируются с различными заболеваниями, поэтому в ряде случаев могут использоваться в качестве биомаркеров для диагностических и

прогностических целей [128, 129]. Однако наиболее интересным направлением современных исследований является внимание к возможности их использования в терапии [130]. Действительно, их ключевая роль в огромном спектре патологических состояний вместе с тем фактом, что одна микроРНК может модулировать экспрессию ряда генов по нескольким сигнальным путям, измененным при заболеваниях, делает их возможными мишенями в диагностических, прогностических и терапевтических целях.

Далее приведены данные по наиболее исследованным некодирующим РНК при ответе на действие ИИ, и играющие важную роль в канцерогенезе.

В работах по изучению днРНК показано, что MALAT1 вовлечен в процессы дисрегуляции клеточного сигналинга, коррелирующие с развитием и прогрессией рака. Вовлеченность этой днРНК в различные патологические пути (MAPK/ERK, PI3K/AKT, WNT/β-catenin и NFkB) приводит к изменению пролиферации, апоптозу, миграции, инвазии, ангиогенезу и туморогенезу [131]. West at al отметили, что MALAT1 является регулятором транскрипции генов, т.к. обнаружили сотни сайтов связывания MALAT1 с некоторыми генами человека [132]. В исследовании действия излучения на клеточные культуры мышей показано, что MALAT1 являлся индуктором повреждения ДНК, что отражалось в повышении его экспрессии в дозо- и времязависимом эксперименте. Дефицит MALAT1 замедлял индуцированную радиацией сверхэкспрессию молекул адгезии эндотелиальных клеток и ослаблял острое и хроническое повреждение тканей. Таким образом, MALAT1 способствовал нежелательной воспалительной реакции и повреждению тканей при лучевой терапии (ЛТ) [133].

В исследовании Chen H. и et al обнаружены активированные гены *P38* и *NFkB* на моделях крыс, у которых искусственным путем вызваны процессы сепсиса. Продемонстрировано, что нокдаун MALAT1 и повышенная экпрессия miR-125b могут подавлять экспрессию генов *P38* и *NFkB*, в то время как активация MALAT1 значительно увеличивает экспрессию этих генов. Эти результаты позволили предположить, что сигнальный путь p38 MAPK/NFkB может быть связан с механизмом MALAT1, регулирующим дисфункцию миокарда, индуцированную сепсисом [134].

Другой перспективной днРНК для исследования патогенеза злокачественных новообразований может являться PINT. ДнРНК PINT ответственен за ингибирование пролиферации, миграцию и инвазию клеток при различных онкозаболеваниях за счет взаимодействия с miR-21, которая вовлечена в процессы канцерогенеза и ассоциирована

с неблагоприятным прогнозом заболевания [135]. Авторами было показано, что активность днРНК PINT регулируется как за счет прямого воздействия P53, так и независимо от его активации. Ингибирование днРНК PINT в отсутствии ДНК-повреждений (и как следствие отсутствия активности P53) приводит к аресту клеточного цикла. Это говорит о том, что днРНК PINT, в определенной степени, самостоятельно регулирует нормальное функционирование клетки и ее пролиферацию. При наличии повреждений днРНК PINT действует как отрицательный регулятор остановки клеточного цикла и как активатор выживаемости через механизм авторегуляции [136].

Еще одной мишенью *P53* является днРНК DINO. Описано, что DINO усиливает активность ответа *P53* путем его связывания и стабилизации (были обнаружены комплексы ТФ P53/DINO, входящие в механизм ответа ТФ P53) за счет баланса MDM2-p53 комплекса. Однако после повреждения ДНК клетки большая часть днРНК DINO была обнаружена в цитоплазме. Следовательно, DINO может иметь и другие клеточные мишени, а также может обладать биологической активностью, которая не зависит от транскрипционного и ядерного опухолевого супрессора *P53* [137].

В эксперименте на мышах показано, что облучение мышей смертельной дозой радиации (12 Гр) с отсутствующей днРНК DINO способствовало большей выживаемости, чем у мышей с нормальным уровнем днРНК DINO, что указывало на то, что клеткам требовалось больше времени для распознавания накопленных клеточных повреждений, хотя в конечном итоге они все равно погибали от радиационного воздействия. Определенная часть экспериментов указывает на ингибирование активности днРНК DINO при различных типах рака [138].

Среди микроРНК важная роль принадлежит miR-21. Увеличение ее активности присуще многим видам злокачественных новообразований и сопровождается такими процессами, как апоптоз, клеточная пролиферация, метастазирование и инвазия. Ингибирование экспрессии miR-21 может подавлять процессы малигнизации [139]. Совокупность активности miR-21 и miR-375 имеет высокую значимость в диагностике заболеваний, а их экспрессия связана с неблагоприятным прогнозом и выживаемостью пациентов. Активация miR-21 определяет ее роль как онкогена, ассоциированного с клеточной выживаемостью и регенерацией, а также ингибитором апоптоза клеток при плоскоклеточного раке гортани (ПРГ) [135].

Изучение miR-27a связано с ее ролью в развитии злокачественных опухолей и является одним из потенциальных биомаркеров в диагностике [140]. MiR-27a является онкогеном, расположенным на 19 хромосоме. Она принимает участие в стимуляции роста новообразований и формировании метастазов. MiR-27a принимает участие в миграции и инвазии раковых клеток [141]. Представлены данные, демонстрирующие корреляцию высокого уровеня экспрессии miR-27a с неэффективностью химиотерапии и, соответственно, с низкой выживаемостью у пациентов со злокачественными заболеваниями [142].

MiR-125b была идентифицирована как онкосупрессор, поскольку ее экспрессия была снижена в опухолевой ткани по сравнению с соседней нормальной тканью при глиомах. Morelli E. et al. показали, что активность miR-125b при миеломе сопровождается апоптозом, повышая чувствительность клеток в действию ИИ [143]. В исследовании микроРНК показано, что сверхэкспрессия микроРНК miR-125b снижала рост глиом за счет активации процессов апоптоза [144].

Исследование роли и изменений в экспрессии различных некодирующих РНК, вовлеченных в процессы канцерогенеза, представляют собой высокий интерес, поскольку являются структурами, играющими предопределяющую роль в диагностике, прогнозе и возможной терапии онкологических заболеваний.

Принцип ЛТ заключается в том, чтобы стимулировать индуцированные повреждения ДНК, ингибировать пролиферацию и влиять на апоптоз злокачественных клеток [145].

Облученные опухолевые клетки (клетки-мишени) могут передавать сигнал к соседним нормальным клеткам (клеткам-свидетелям) посредством секреции ряда факторов. Обнаружено, что компонентами этих веществ могут являться АФК, цитокины (Il1, Il6, TNFα) и другие метаболиты, которые проникают в соседние необлученные клетки и, накапливаясь там, могут вызывать ответные реакции (цитогенетические, биохимические и морфологические), аналогичные с наблюдаемыми в самих облученных клетках [146].

Радиотерапия является основным методом лечения злокачественных новообразований. Однако эффекты радиотерапии ограничены высокой радиорезистентностью опухолевых клеток при непрерывном и фракционированном облучении [146], а также побочными реакциями в нормальных тканях, окружающих

опухоль. В настоящее время важным остается выяснение границ терапевтического окна между контролем роста опухоли и повреждением нормальных тканей. Хотя усовершенствованные методы радиотерапии и фракционированное облучение привели к повышению эффективности ЛТ и снижению осложнений в окружающих нормальных тканях, дальнейшее расширение терапевтического окна имеет высокое клиническое значение. Стратегии могут быть следующие: радиосенсибилизация опухолевых клеток без увеличения чувствительности нормальных клеток, или специфическая защита нормальных тканей. Однако для обоих механизмов важным остается понимание молекулярно-генетических процессов, происходящих в клетках в ответ на действие ИИ [67].

По этой причине рядом авторов предложено предварительное облучение опухоли в малой дозе, после которой нормальные клетки, окружающие опухоль, становятся устойчивыми к действию высоких доз [19, 77]. Изучение ответа нормальных и злокачественных клеток на воздействие МДР и ВДР по критериям активности ряда генов, микроРНК и днРНК и явилось предметом настоящего исследования. При этом нами изучался комплекс генов и некодирующих РНК во взаимодействии между собой в нормальных и онкотрансформированных тканях, в том числе радиоиндуцированных опухолях, *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, исследуемые показатели могут служить возможными ранними биомаркерами радиоиндуцированного опухолеобразования.

Глава 2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы и препараты

В работе были использованы:

Опухоли карциномы гортани, нормальные ткани и кровь пациентов с поставленным диагнозом плоскоклеточный рак гортани (ПРГ) (любезно предоставленные к.м.н. врачом-патологоанатомом Бахтиным Артуром Александровичем ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА России»), а также кровь пациентов-доноров (Центр переливания крови Минздравсоцразвития России).

Культуры клеток: культура клеток легочной карциномы Льюиса (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина), культура клеток Jurkat (ФМБА им. А.И.Бурназяна).

Лабораторные мыши: модель мышей-самок линии C57Bl/6 (питомник «Пущино»), мыши-гибриды самцы линии (CBA × C57Bl) F1 (питомник «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).

Для взятия биоматериалов использовали: Ficoll-Paque с плотностью 1.077 г/мл (Pharmacia, Швеция), культивирование стимулированных к пролиферации лимфоцитов в среде RPMI-1640, набор для определения жизнеспособности клеток набора Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., США), фосфатно-солевой буфер pH 7,2 (PBS) (Sigma-Aldrich), формальдегид, раствор Буэна, среда RPMI - 1640, pH 7,35 («Sigma», США), р-р Хэнкса (Sigma-Aldrich, США), ЭДТА, этиловый спирт, хлорид натрия, хлороформ (Химмед, Россия), изопропиловый спирт.

Набор для экстракции РНК «Trizol RNA Prep 100» (ООО Лаборатория Изоген, Россия), реагент Trizol (гуанидинтиоционат с фенолом, pH=4,0).

Набор для получения кДНК: лиофилизированный набор для ОТ «GenePak RT Core» («Promega», США), «stem-loop» - праймеры (ООО «ДНК-Синтез», Россия).

Наборы для проведения ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ): SYBR Green I (Thermo Scientific, США), TaqMan (Thermo Scientific, США). Олигонуклеотиды («Литех» и «ДНК-синтез», Россия).

Наборы для определения концентрации РНК и ДНК Quant-iT™ RNA buffer, Quant-iT™ RNA reagent (Invitrogen, США).

2.2. Оборудование

Гамма-установка Панорама-3С («РенМедПром», Россия), рентгеновская установка РУБ РУСТ М1 (ООО Диагностика М, Россия).
Термолюминесцентные дозиметры (Россия), штангенциркуль, закрытые чашки Петри, плексиглазовый планшет, микропланшетный ридер (Bio Rad Elisa Reader, США), CO_2 (инкубатор Sanyo MSO-5AC, Япония), Гомогенизатор Daihan HS (DAIHAN Scientific, Ю. Корея), Флуориметр Qubit™ («Invitrogen», США), Амплификатор «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Россия), Амплификатор ДТ-прайм («НПО ДНК-технология», Россия), pH-метр (Hanna instruments, Италия), микроцентрифуга (MicroSpin FV-2400, BioSan, США), микроцентрифуга (MiniSpin, Eppendorf, Германия), Весы (Ohaus, Китай).
Дозаторы 0,5-10 мкл, 5-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (Biohit, Proline Plus, Финляндия), Термостат (TDB-120, BioSan, США).

Для работы с мышами использовали ламинар (Ламинарные системы, Россия), а для выделения РНК и получения кДНК использовали ламинары (Esco, Сингапур).
Олигонуклеотиды были синтезированы («ДНК - Синтез», Россия). Последовательности RT-праймеров приведены в таблице (Таблица S3 Приложение). Последовательности специфических праймеров к генам, днРНК и микроРНК для проведения ПЦР-РВ выбраны с помощью программы NCBI Primer-BLAST и на основании литературных данных (Таблица S4 Приложение).

Для обработки полученных результатов использовали следующие программы обеспечение: Microsoft Office (Excel) 2010, Statistica 7.0, Adobe Photoshop (CC) и интернет-ресурсы: NCBI Primer-BLAST.

2.3. Объекты исследований

2.3.1. Биоптаты опухолей человека

Объектом исследования являлись биоптаты опухолей и тканей, окружающих опухоль (незадействованных в патологический процесс) 35 пациентов, в возрасте от 30 до 74 лет, с диагнозом плоскоклеточный рак гортани согласно классификации от T1N0M0 до T4N1M0, где T – распространение первичной опухоли, N – отсутствие/наличие метастазов в регионарных лимфоузлах и степень их поражения, M – отсутствие/наличие метастазов в отдаленных лимфоузлах (табл. 1). Больные находились на стационарном лечении в ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА России» в

городе Москва. От всех пациентов имеется письменное информированное согласие на участие в исследовании, эксперименты соответствуют этическим принципам Хельсинкской Декларации и стандартам биоэтического комитета ГУ НИИ МББ СО РАМН.

Таблица 1. Медико-статистическая информация по пациентам с раком гортани.

№ образца	Возраст пациента	Пол	Клинический диагноз
1	55	Ж	Рак гортани T1N0M0, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак с кератозом
2	51	М	T2N1M0, 3 стадия, рецидив, умереннодифференцированный плоскоклеточный неороговевающий рак
3	55	М	Рак гортани T3N0M0
4	74	М	Рак гортани T4N1M0
5	63	М	Рак гортани T3N0M0, 3 стадия (рецидив), низкодифференцированный (плоскоклеточный?) рак
6	52	М	Рак гортани T3N0M0
7	58	М	Рак гортани T3N0M0, 3 стадия, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак с ороговением
8	63	М	Рак гортани T3N0M0, 3 стадия, рецидив, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак
9	61	М	Рак гортани T3N0M0
10	60	М	Рак гортани T2N0M0
11	30	Ж	Рак гортани T3N1M0, низкодифференцированный плоскоклеточный рак
12	67	Ж	Рак гортани T2N0M0, высокодифференцированный плоскоклеточный рак
13	50	М	Рак гортани T3N0M0, рецидив, переходноклеточный рак
14	60	Ж	Рак гортани T3N0M0, 2 стадия, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак
15	65	М	Рак гортани T2N0M0
16	44	М	Рак гортани T2N0M0
17	54	М	Рак гортани T3N1M0, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак

18	-	М	-
19	-	М	Высокодифференциированный плоскоклеточный рак
20	-	М	-
21	-	м	Рак гортани T3N1M0 низкодифференцированный адено-плоскоклеточный рак
22	-	ж	-
23	-		-
24	-	м	Низкодифференцированный плоскоклеточный рак с признаками аденогенной дифференцировки
25	-	м	
26	-	-	Умереннодифференцированный плоскоклеточный рак
27	-	-	Умереннодифференцированный плоскоклеточный рак
28	-	-	-
29	-	-	-
30	66	м	Рак гортани T3N0M0, 3 стадия, умереннодифференцированный неороговевающий плоскоклеточный рак
31	65	м	Рак гортани T2N0M0, 2 стадия, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак
32	58	м	Рак гортани T3N0M0, низкодифференцированный плоскоклеточный рак
33	-	ж	Рак гортани T1N0M0, умереннодифференцированный рак
34	36	-	Рак гортани T0N0M0, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак
35	42	м	Рак гортани T4N0M0, умереннодифференцированный плоскоклеточный рак

2.3.2. Контрольная группа пациентов

Контрольной группой для пациентов с опухолями гортани служил материал тех же пациентов, у которых брали биопсию эпителия, находящегося в непосредственной близости от опухоли (по результатам гистологии - нормальные ткани), либо ткани пациентов без онкологических патологий (неонкологические патологии голосовых складок и гортани (паралич, стеноз гортани) – J38 по МКБ).

В исследовании контрольной группой для оценки показателей крови служили 27 здоровых доноров (согласно документам Центра переливания крови) в возрасте 41,5±23 года. Все пациенты были обследованы на инфекционные болезни (ВИЧ, сифилис, гепатит) и признаны здоровыми.

2.3.3. Клеточные культуры

Объектом исследования являлись лимфоциты цельной крови здоровых доноров и клеточная линия Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), которые были любезно предоставлены д.м.н. Осиповым Андреяном Николаевичем (ФМБА им. А.И.Бурназяна).

Часть исследования проводилась на культуре клеток легочной карциномы Льюиса мышей (любезно предоставленные к.ф.-м.н. Липенгольцем А.А., НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

2.3.4. Лабораторные животные

В работе использовали 40 мышей в возрасте 4х недель линии C57Bl/6 и 183 самцов мышей-гибридов линии (CBA × C57Bl) F1 (питомник «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Содержание мышей осуществляли в теплых, сухих, светлых помещениях со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты с животными проводили согласно распорядительного документа ECC Directive 2010/63/EU.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Культура клеточной линии Jurkat и лимфоцитов человека

2.4.1.1. Выделение и условия культивирования лимфоцитов крови человека

Получение клеток крови здоровых доноров осуществляли по стандартному протоколу в течение суток после взятия крови в индивидуальные фальконы с ЭДТА для предотвращения коагуляции. Мононуклеарные клетки периферической крови были разделены с помощью фикола в соответствии с протоколом производитеоя. Мононуклеарный слой клеток был отмыт с помощью PBS-буфера. Далее клетки были посчитаны и ресуспендированы в 10 мл среды RPMI-1640 при нейтральном pH, содержащей 10% ФГА и телячьей эмбриональной сыворотки и по 1% пенициллина и

стрептомицина. Финальная концентрация составляла $1x10^6$ клеток/мл. Далее проводили инкубацию (37°C и 5% CO_2) в течение 43 часов.

Аналогичные условия культивирования использовались для клеток линии Jurkat. Однако культуральная среда не содержала ФГА. Остальные компоненты сохранялись в таком же соотношении.

2.4.1.2. Облучение нормальных лимфоцитов и клеток Jurkat

Образцы клеток (нормальные и злокачественные) были разделены на четыре группы и держались в закрытых чашках Петри. Инкубационный период составлял 36 часов после чего часть образцов была подвержена первому облучению на рентгеновской установке РУБ РУСТ-М1 в дозе 0,1 или 5 Гр при мощности дозы 0,2 Гр/мин (200 кВ, 1.2 мА, 1.5 мм Al). Одна из групп образцов лимфоцитов не облучалась и использовалась в качестве контрольной группы.

Та часть клеток, которую облучили в дозе 0,1Гр, повторно подвергли воздействию рентгеновского облучения в дозе 5 Гр через 4 часа для оценки влияния исходной малой дозы.

Через 20 часов после облучения все клетки были изучены по показателям выживаемости и активности молекулярно-генетических показателей.

2.4.1.3. Определение жизнеспособности клеток

Набор Cell Counting Kit-8 позволял оценить выживаемость клеток в исследуемых группах. Для этого в ячейки планшета к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора Cell Counting Kit-8. С помощью спектрального анализа фиксировали число живых клеток с помощью микропланшетного ридера Bio Rad Elisa Reader при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 690 нм).

2.4.2. Культура легочной карциномы мышей

2.4.2.1. Получение опухолевой суспензии

Для получения опухолевой суспензии извлекали опухоль у мыши – донора. Делали навеску опухоли (4г) добавляли р-р Хенкса (24мл). Измельчали палочкой в ступке. Продавливали через сито, для отфильтрации опухолевой массы. Полученный раствор в объеме 0,2 мл вводили мышам (10^5 клеток в 0,2 мл р-ра Хенкса/ животное).

2.4.2.2. Трансплантация карциномы легких Льюиса

Клетки опухолевой ткани вводили подкожно с помощью шприца в правую заднюю лапу мышам линии C57Bl/6 (самки). Мышей выводили из эксперимента путем декапитации на 14 и 22 сутки после введения опухоли.

2.4.2.3. Определение параметров опухолевого роста

С момента, когда опухоли возможно было пропальпировать, каждые 2-3 дня их измеряли с помощью штангенциркуля (рис. 10). Объем опухоли вычисляли по формуле: $\pi/6$* длина* высота* ширина. По окончании каждого эксперимента мыши были препарированы, опухоли изъяты и взвешены. Вес опухоли определяли, как разницу между весом лапы с опухолью и противоположной лапы без опухоли [147].

Рис 10. Мышь с трансплантированной карциномой Льюиса на 19 день эксперимента

2.4.2.4. Облучение мышей в малой дозе (75 мГр)

Объектом исследования служили 40 мышей - самок C57Bl/6 с массой 20-22г, которым трансплантировали подкожно в правую заднюю лапу 14%-ую суспензию диспергированной опухолевой ткани в объеме 0,2 мл.

Мыши были распределены на следующие группы: группа, по которой оценивалась выживаемость после облучения (8 шт.); биоконтроль (4 шт.); мыши с трансплантированной опухолью (6 шт.); мыши с трансплантированной опухолью, подвергшиеся облучению в МДР (6 шт.).

Тотальное рентгеновское облучение в дозе 75 мГр производили на аппарате РУСТ М1 на 10-е сутки после трансплантации с расположением каждой мыши в отдельной ячейке планшета. Пониженную мощность дозы (0,154 Гр/мин) получали путем снижения тока на трубку до 0,7 мА при напряжении 200 кВ. Дозиметрию в ячейках планшета проводили с помощью термолюминесцентных дозиметров. Измерение опухоли у каждого животного производили каждый день, начиная с 13-х суток (когда объем опухоли был достаточно выражен) после введения клеток, за исключением выходных.

Животных с опухолями подвергали эвтаназии на двух сроках (на 14 и 22 сутки) после трансплантации опухолевых клеток и облучения для взятия тканей на молекулярно-генетические исследования. Схема опыта изображена на рис. 11.

Рис. 11. Схема опыта на мышах с перевитой карциномой Льюиса и облучением в малой дозе

В эти же сроки подвергали эвтаназии интактных мышей (без опухоли и облучения), служивших биоконтролем. Часть животных в каждой из 2-х групп выделяли

для наблюдения за выживаемостью вплоть до полного падежа, реализующегося примерно в течение 3-х недель после трансплантации опухолевых клеток.

2.4.2.5. Пролонгированное облучение мышей

В данном эксперименте использовали мышей-гибридов (CBA × C57Bl) F1, самцов массой 20–24 г, поставляемых питомником «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в необходимых условиях. Исследования проводились в соответствии с требованиями нормативно-правовых актов.

Для проведения экспериментов до начала опыта проводили подбор подопытных групп мышей с учетом их общего состояния и динамики веса. Тщательно отобранных животных подвергали пролонгированному облучению. Всего исследовалось 183 мыши (89 и 94 на 8 и 10 месяцы, соответственно).

Мышей после получения из питомника держали на карантине около 7 дней в виварии ГМЦ им. А.И. Бурназяна, а затем перевозили в виварий МГАВМиБ им. К.И.Скрябина, где их держали до набора массы около 22-24 г, после чего подвергали облучению.

Низкомощностное пролонгированное облучение мышей проводили на кафедре радиобиологии МГАВМиБ им. К.И.Скрябина в общей дозе 12,6 Гр на цезиевой гамма-установке Панорама-3С (10 мГр/мин) в течение 21 часа.

Равномерность радиационного поля с мощностью дозы в диапазоне 0,95-1,02 Р/мин была достигнута в пространстве, вмещавшем 4 клетки с мышами по 10 в каждой, при расстоянии 1,2 м до источников. Поглощенная доза составляла 0,91-0,98 сГр/мин и фиксировалась как внутри, так и вне клеток. Экранирующий эффект стенок пластмассовой клетки практически отсутствовал. Примерно через 5 – 7 дней после окончания облучения животных возвращали в виварий ФМБЦ.

Через 8 и 10 месяцев после облучения мышей забивали и определяли клеточность костного мозга по числу ядросодержащих клеток в одной бедренной кости, число эндогенных колоний на селезенку и массу селезенки, фиксированной в растворе Буэна.

Для получения сопоставимых результатов лучевое воздействие осуществляли в одно и то же время суток.

После облучения определяли жизнеспособность клеток и профили экспрессии мРНК генов, днРНК и микроРНК в костном мозге, полученном от 89 и 94 мышей на 8 и 10 месяц после облучения, соответственно.

2.4.2.6. Получение биологического материала мышей

Мышей линии C57Bl/6 подвергали эвтаназии методом декапитации для сбора цельной крови. После этого извлекали бедренные кости. Концы костей удаляли, диафизы дважды промывали 0,8 мл буфера RPMI-1640 с pH=7,2 с содержанием в 0,1 мкл 0,5-2x10^6 клеток. Полученная суспензия костного мозга, а также извлеченные органы: селезенка, тимус, печень, опухоли большой бедренной кости замораживали при -70^{0}C.

Мышей линии (CBA×C57Bl) F1 подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков, после чего извлекали костный мозг из бедренных костей, как указано выше.

Данные по массе органов мышей, инокулированных опухолевыми клетками Льюиса приведены в таблице S1 и S2 приложения.

2.4.3. Получение гомогената органов и тканей

Замороженные навески тканей и органов мышей, а также биоптаты опухолей и нормального эпителия пациентов с ПРГ массой примерно 0,05 г подвергали измельчению с помощью установки Daihan HS (DAIHAN Scientific, Ю. Корея) в растворе органического растворителя (тризол) или в фосфатном буфере (в объеме 1000 мкл).

2.4.4. Выделение нуклеиновых кислот

Для удаления белков и большинства свободных нуклеотидов предпочтительным методом является экстракция смесью фенол/хлороформ и осаждение РНК - транскриптов этанолом с помощью набора «Trizol RNA Prep 100».

В пробирку объемом 1,5 мл вносили 100 мкл исследуемого образца, после чего добавляли 1 мл тризола и интенсивно перемешивали до гомогенной эмульсии. Переносили пробирки со смесью в холодильник на 5 минут при 4^{0}C. После этого добавляли 200 мкл раствора хлороформа, перемешивали содержимое и снова охлаждали. Фенол помогает денатурировать белки, пока они все еще находятся в водном растворе.

Насыщенный буфером фенол имеет плотность, которая лишь немного выше, чем у воды. Таким образом, если водная фаза содержит достаточное количество соли или любых других растворенных веществ, которые увеличили бы ее плотность, то можно получить инверсию фазы во время экстракции, когда водная фаза находится под фенолом, а не поверх него. Хлороформ значительно плотнее воды, поэтому добавление его в органическую фазу увеличивает общую плотность этой фазы, помогая предотвратить инверсию фазы. После 5 мин при 4^0С пробирки центрифугировали при 14000 об/мин для расслоения фаз. В процессе центрифугирования происходит разделение раствора на слои в результате денатурации белков, и скопления РНК в верхнем слое. Прозрачную верхнюю фазу аккуратно перенести в новую пробирку, не задевая пограничные слои с протеинами и ДНК. Следующий этап позволяет сконцентрировать РНК, благодаря добавлению 600 мкл изопропанола. Содержимое пробирок ресуспендировали и оставляли на холоде при -20^0С на 30 минут.

Затем центрифугировали при 14000 об/мин 15 минут. Надосадочная жидкость удалялась, полученнеый осадок просушивался в течение 10 минут при 65^0С.

Добавляли 50 мкл ЭкстраГена Е, ресуспендировали и прогревали 5 минут при 65^0С, а затем еще раз перемещивали на вортексе в течение 15-20 секунд [148].

2.4.5. Измерение концентрации РНК

Оценку концентрации РНК проводили на флуориметре Qubit («Invitrogen», США) с использованием набора реактивов Quant-iTTMRNA Assay Kit («Invitrogen», США) согласно протоколу фирмы - производителя.

Смесь готовили с расчетом количества исследуемых проб. Предварительный раствор состоял из 1 мкл красителя (Qubit- reagent) и 199 мкл буфера для разведения. К 198 мкл рабочего раствора добавляли 2 мкл исследуемой пробы, перемешивали на вортексе и измеряли на приборе. Средняя концентрации РНК находилась в диапозоне 0,5-30 нг/мкл.

2.4.6. Обратная транскрипция для мРНК генов, днРНК и микроРНК мышей и человека

Образование комплементарной ДНК (кДНК) проводили с помощью набора лиофилизированных реагентов «GenePak RT Core». Реакция обратной транскрипции (ОТ) со случайными затравками основана на отжиге праймеров на РНК-матрице в многочисленных местах, и связана с образованием кДНК.

Реакция ОТ проводилась согласно протоколу производителя: к леофилизированной смеси добавляли ОТ-Растворителя (5 мкл) и 5 мкл исследуемой РНК. Отрицательным контролем служил ОТ - растворитель, к которому добавлялось 5 мкл очищенной воды (без нуклеаз). Смесь интенсивно перемешивалась на вортексе а затем пробирки термостатировали 40 минут при 50^0С. Для остановки фермента обратной транскриптазы в пробирки добавляли 10 мкл Стоп - раствора, после чего инкубировали еще 10 мин при 95^0С. Полученные образцы кДНК хранились при -20^0С.

2.4.7. Обратная транскрипция для зрелых микроРНК

Полученная РНК, выделенная тризольным методом, содержала фракцию зрелых микроРНК размером 20-25 п.н. Для проведения реакции ОТ для микроРНК была применена технология «stem-loop» праймеров, которая обеспечивает лучшую специфичность и чувствительность, по сравнению с протоколом, в котором используются линейные праймеры. Технология основана на присоединении «stem-loop» к 3’-концу микроРНК, тем самым инициируя реакцию ОТ [149]. Специфичность «stem-loop» праймеров обеспечивается за счет удлинения цепочки микроРНК на 6 нуклеотидов, которые также используются в качестве матрицы для синтеза кДНК (рис. 12). Прямые праймеры специфичны для последовательности микроРНК, но исключают последние 6 нуклеотидов на 3’-конце. К каждому прямому праймеру добавляют удлинение на 5-7 нуклеотидов на 5’-конце для повышения температуры плавления.

Реакция ОТ для микроРНК осуществлялась с использованием набора «GenePak RT Core» согласно протоколу производителя. В пробирки с лиофилизированной смесью добавлялось необходимое количество общей РНК и 5 мкл специфического «stem-loop» - праймера к исследуемой микроРНК, последовательность и конечная концентрация которых представлена в табл. S3 приложения.

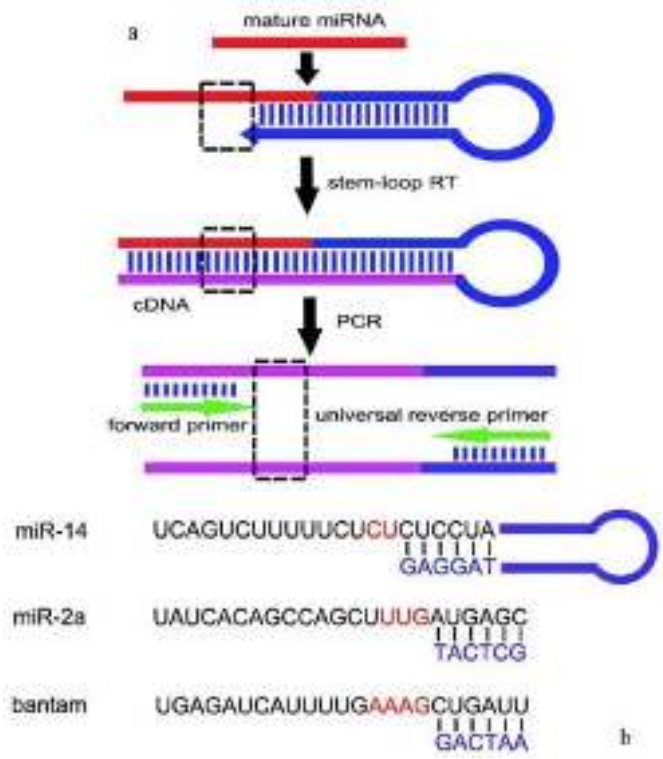


Рис.12. Схематичное представление специфического «stem-loop» праймера к микроРНК (адапт из работы [70])

ОТ проводили на амплификаторе «Терцик» (Россия). Отжиг «stem-loop» праймеров осуществляли 30 мин при 16^0С, синтез кДНК – 30 мин при 42^0С, и остановка реакции - 5 мин при 85^0С. В качестве контроля использовали реакционную смесь, не содержащую РНК. Синтезированные микроРНК хранились при -70^0С.

2.4.8. Подбор праймеров для целевых генов для постановки ПЦР-РВ

Подбор олигонуклеотидной последовательности праймеров с необходимыми характеристиками и флуорецентно-меченных зондов к исследуемым генам осуществлялся с помощью биоинформационной базы данных NCBI, а также с использованием различных научных статей, в которых была приведена информация об интересуюших нас показателях. Основными условиями подбора праймеров являлись размер праймеров (минимум 16 п.н.), элиминация праймерных димеров, GC-состав (50-60%) и разница между температурами плавления для прямого и обратно праймера не более 6^0С [150].

Важно было исключить наличие неспецифических продуктов ПЦР, оцениваемое по пикам на кривых плавления: один остроконечный пик при температуре плавления

76,4^{0}С (рис. 13). Кроме того, важным критериев являлось отсутсвие амплификации в орицательных контролях (пробы без добавления кДНК).

За основу брались рекомендованные условия проведения реакции ПЦР-РВ из зарубежных источников литературы, и кроме того, наши собственные данные. Но поскольку приборы, на которых проводится данная методика и наборы используемых реактивов варьируют, необходимо было подобрать индивидуальные условия работы, для получения более точных результатов с концентрационной зависимостью полученного продукта в результате ПЦР-РВ (табл. S4 приложения).

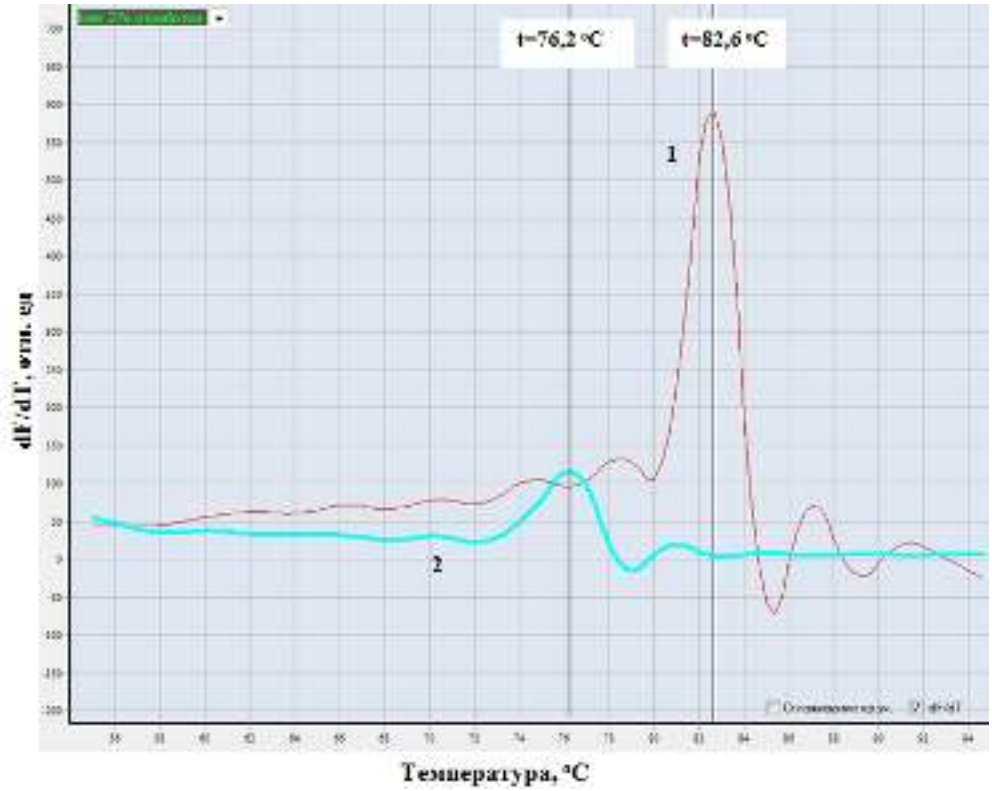


Рис. 13. Кривые плавления продуктов ПЦР с красителем SybrGreen I для микроРНК miR-27a (1) и димера праймера, не содержащего кДНК (2). Ось абсцисс - температура плавления фрагмента кДНК, ^{0}С, Ось ординат - интенсивность флуоресценции (dF/dT), отн.ед.

2.4.9. Анализ полученных данных

При анализе экспрессии кДНК с использованием ПЦР-РВ, традиционно используются эталонные гены для контроля возникновения ошибок в образцах.

Основным методом нормализации уровня исследуемой кДНК являются гены домашнего хозяйства (референсный гены) за счет своего относительно постоянного

уровня экспрессии в рассматриваемых экспериментах. В качестве таких генов нами были выбраны для анализа *GAPDH* и *β-actin*.

Расчет экспрессии исследуемых генов и микроРНК проводили относительно референсных генов по методу ΔΔCt с учетом эффективности амплификации (E) [151].

Экспрессию исследуемых параметров расчитывали по формулам (1) и (2):

экспрессия исследуемого гена = $E\text{-}\Delta C_t$, (1)

где E – эффективность амплификации, которая в идеальных условиях равна 2;

C_t (threshold cycle) – пороговый цикл, при котором уровень флуоресценции, пересекает уровень фоновой флуоресценции.

$\Delta C_t = C_t$ (housekeeping ген) – C_t (исследуемый ген) (2)

Оценку изменения экспрессии генов в исседуемой группе по сравнению с тем же показателем в контрольной группе вычисляли по формуле (3):

изменение экспрессии исследуемого гена = $2\text{-}\Delta\Delta C_t$, (3)

где $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ опыт - C_t контроль.

2.4.10. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ STATISTICA 7.0 и включала в себя определение медианы и 25% и 75% квартилей [152]. Каждая ПЦР проводилась не менее 2-х раз, для оценки значимости различий применяли критерий Стьюдента и непараметрические критерии Манна-Уитни, Фишера. В присутствии нулевого варианта использовали тест Шеллинга-Вольфейля.

Значения медианы в контрольной группе были приняты за единицу, а значения медианы в исследуемых группах показывали во сколько раз уровень экспрессии исследуемых показателей выше или ниже по отношению к медиане контрольной группы.

Корреляционные зависимости рассчитывали по непараметрическому критерию Манна - Уитни поскольку большая часть данных не подчинялась нормальному распределению и по ранговому критерию Спирмена. Для малых выборок (сравнение 1-2 и 3-4 стадий заболевания у пациентов с ПРГ) сравнение проводилось по критерию

Фишера. Данные считали статистически значимыми при $p<0,05$, где p - показатель статистической значимости данных. Также, для оценки корреляции нами был применен регрессионный анализ.

Глава 3.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Изучение генов, регулируемых некодирующими РНК, при развитии ПРГ, как возможных показателей прогноза заболеваний

Задачей данного этапа являлось оценка вовлеченности различных показателей в процессы злокачественной трансформации карциномы гортани, поскольку эпигенетические изменения присутствуют во всех видах онкозаболеваний человека, и в настоящее время известно, что они связаны с генетическими изменениями, определяющими фенотип рака. Эти изменения включают метилирование ДНК, модификации гистонов, микроРНК и другие компоненты хроматина. Из изменяющихся сотен микроРНК и днРНК в данном исследовании нами проверена возможность использования наиболее перспективных из них, таких как miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-101, miR-181a и днРНК MALAT1, ROR и NEAT1 с повышенной экспрессией в опухолях пациентов с плоскоклеточным раком гортани (ПРГ), а также miR-124, miR-125b, содержание которых может как увеличиваться, так и снижаться [140, 153-155].

3.1.1. Исследование активности генов, днРНК и микроРНК при развитии ПРГ *in vitro*

Исследование выбранных нами показателей может иметь как диагностическую, так и прогностическую значимость. Результаты экспрессии, полученные при исследовании опухолевого материала и периферической крови всех 35 пациентов вне зависимости от пола, стадии заболевания и возраста до лечения представлены в табл. 2.

Таблица 2. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК в опухолевой ткани и крови пациентов с ПРГ

Показатель	Биоптат ткани		Периферическая кровь	
	Опухоль	Контроль (окружающая опухоль ткань)	Пациенты	Доноры
мРНК гена *P53*	0,78 [0,43-1,03]	1,0 [0,46-1,32]	-	-
мРНК гена *CCND1*	0,812 [0,47-1,32]	1,0 [0,55-1,87]	**24,3*** [11,3-34,3]	1,0 [0,5-2,83]
мРНК гена *ORAOV1*	0,8 [0,004-2,46]	1,0 [0,2-3,2]	-	-
мРНК гена *PTEN*	**0,57*** [0,32-0,93]	1,0 [0,53-2,0]	**2,55*** [2,0-3,03]	1,0 [0,57-2,0]

днРНК NEAT1	1,23 [0,81-2,46]	1,0 [0,75-1,62]	**1,7*** [1,6-2,64]	1,0 [0,4-1,86]
днРНК MALAT1	1,23 [0,75-2,14]	1,0 [0,49-1,57]	**2,0*** [1,31-2,63]	1,0 [0,46-2,0]
днРНК ROR	1,14 [0,71-1,86]	1,0 [0,55-1,8]	1,27 [0,68-2,22]	1,0 [0,55-1,68]
микроРНК miR-21	**7,5*** [5,2-13]	1,0 [0,57-2,1]	**73,73*** [21,11-137,18]	1,0 [0,21-3,06]
микроРНК miR-27a	**0,53*** [0,25-1,3]	1,0 [0,5-2,4]	**3,48*** [1,07-8,57]	1,0 [0,01-2,47]
микроРНК miR-34a	0,96 [0,21-1,19]	1,0 [0,25-3,68]	-	-
микроРНК miR-101	0,93 [0,5-1,9]	1,0 [0,4-1,9]	-	-
микроРНК miR-124	0,81 [0,35-1,31]	1,0 [0,5-1,31]	**0,015*** [0,005-0,27]	1,0 [0,07-2,73]
микроРНК miR-125b	1,52 [0,06-0,6]	1,0 [0,59-6,59]	-	-
микроРНК miR-181a	-	-	1,31 [0,3-3,4]	1,0 [0,4-3,03]

Примечание. - отличия с показателями группы «Контроль» и «Доноры» статистически значимы (p<0,05).*
Медиана групп контроля («окружающая опухоль ткань», или «доноры» для крови) принята за единицу

Следует обратить внимание на то, что изменение содержания генов и их регуляторов в опухолях существенно отличалось от их изменения содержания в крови. Так, проведенное исследование позволило установить, что из всех изученных нами показателей статистически значимые различия между опухолью и контрольным плоскоклеточным эпителием наблюдались для *PTEN*, miR-21 и miR-27a. Содержание мРНК гена *PTEN* в опухолях составляла 0,57, что почти в 2 раза ниже контрольного уровня, принятого за единицу, экспрессия микроРНК miR-21 была увеличена в 7,5 раз в опухолевой ткани, а микроРНК miR-27a - снижена почти в 2 раза по отношению к контрольной группе (p<0,05).

Регулятор клеточного цикла и супрессор опухолей *PTEN* сдерживает пролиферацию, выживаемость и рост клеток. Полученный нами результат о снижении содержания гена *PTEN* при ПРГ соответствует литературным данным о функционировании его как онкосупрессора[156].

Как видно из табл. 2, экспрессия miR-21 увеличивается в опухолях в 7,5 раз по сравнению с контрольной группой, что указывает на его роль, как онкогена.

Аналогичные результаты были получены также другими авторами по изменению значения активности miR-21 в опухолях гортани [157]. MiR-21 играет важную роль в процессах онкогенеза: ассоциируется с плохим прогнозом, сниженным апоптозом, высокой инвазией и возможностью к метастазированию [154].

В работах по исследованию miR-27a показано, что для многих типов опухолей данная микроРНК, является онкогеном, стимулирующая рост опухоли и развитие метастазов за счет поддержания процессов миграции и инвазии раковых клеток [141, 142]. Нами получены результаты о снижении экспрессии miR-27a при ПРГ, что соответствует литературным данным о возможном проявлении miR-27a как онкосупрессора в случае плоскоклеточной карциномы [158]. По остальным показателям, исследуемым в биоптатах ПРГ, нами не было выявлено статистически значимых различий в экспрессии генов по сравнению с группой контроля. Отсутствие изменений можно объяснить тем, что в качестве контроля нами использовался эпителий здоровых тканей, расположенных в непосредственной близости с опухолью, клетки которой выбрасывают экзосомы, содержащие мРНК, микроРНК и днРНК, для осуществления межклеточной коммуникации, что может приводить к увеличению экспрессии исследуемых нами показателей в окружающих опухоль тканях [159]. Во многих исследованиях других авторов, в качестве контроля использовался биоптат плоскоклеточного эпителия гортани, взятого у добровольцев с диагнозами, не связанными с онкологией [142].

Сравнение изученных показателей в крови доноров и больных ПРГ подтверждает влияние опухолей на содержание РНК-продуктов в других тканях. В этом случае в качестве контроля использовалась периферическая кровь доноров, не имеющих онкологических заболеваний. При исследовании периферической крови отмечены 7 показателей, для которых уровень транскрипционной активности существенно отличается от таковой в группе доноров. Содержание мРНК гена *CCND1* в периферической крови у онкобольных в 24,3 раза выше, чем у здоровых доноров, мРНК гена *PTEN* - в 2,55. Кроме того, статистически значимо повышается активность днРНК MALAT1 и NEAT1 - в 2 и 1,7 раз, соответственно. Транскрипционная активность miR-21 в 73,7 раза выше уровня нормы, а активность miR-27a - в 3,48 раз. Для miR-124 наблюдается снижение активности в 67 раз в крови больных ПРГ по сравнению со здоровыми донорами. Полученные данные позволяют говорить только о

диагностической значимости, поскольку в таблице приведена выборка значений, полученных от всех опухолей без их дифференцировки по стадиям.

Оценить прогноз течения онкологического заболевания можно на основе изучения активности биомаркеров, позволяющих различать 1-2 и 3-4 стадии развития опухоли. Известно, что у больных 3-4 стадии прогноз значительно хуже, чем у больных 1-2 стадии как по качеству жизни после лечения, так и по её продолжительности [160, 161]. Распределение пациентов (%) с высокими и низкими значениями исследуемых показателей для 1-2 стадии и 3-4 стадии ПРГ представлено на рис. 14 и 15.

В качестве контрольной группы были выбраны показатели экспрессии генов в окружающей опухоль нормальной ткани у больных 1-2 стадии ПРГ. Медиана контрольной группы принята за единицу. Изменения показателя более чем в 2 раза считалось как высокое (>2) или низкое (<0,5) значение. Высокий уровень содержания отмечался в таблице знаком ↑, низкий уровень - ↓. Число обследованных в каждой группе принято за 100%. Результаты представлены в процентах относительно общего числа пациентов соответствующей группы.

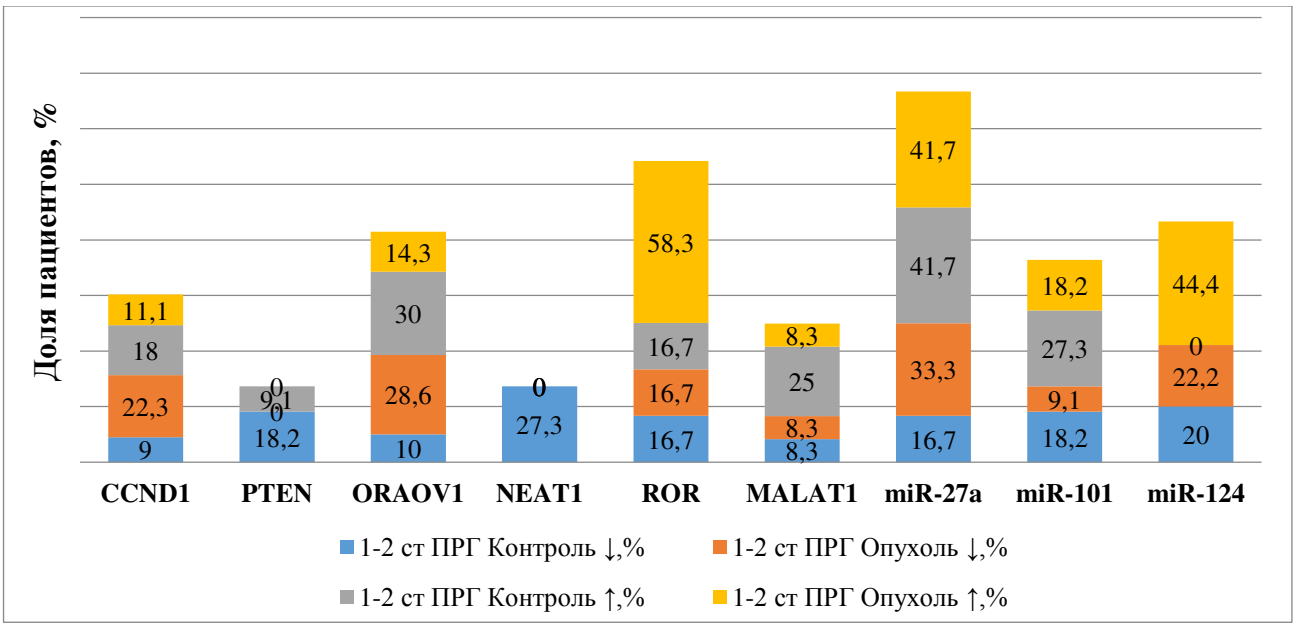


Рис 14. Доля пациентов с ПРГ и контрольная группа 1-2 стадии (17 человек) с изменяющейся экспрессией некодирующих РНК и белок-кодирующих, выраженное в процентах

NEAT1 является мишенью гена *P53*. Он стимулирует инициацию и прогрессирование опухоли, модулируя экспрессию генов, участвующих в регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток, миграции, инвазии, метастазировании и

мезенхимально-эпителиальном переходе. Повышенный уровень днРНК NEAT1 сказывается на химио- и радиорезистентности клеток, за счет подавления активности *P53*, что указывает на потенциал NEAT1 в качестве нового диагностического биомаркера и терапевтической мишени у онкологических больных [162]. Проведенное нами исследование показывает прогностическую значимость днРНК NEAT1, поскольку у больных 3-4 стадии наблюдается статистически значимое увеличение содержания NEAT1 как в опухоли, так и в окружающей ее ткани у 40% и 28,6%, соответственно, по сравнению с группой больных 1-2 стадии (рис. 15).

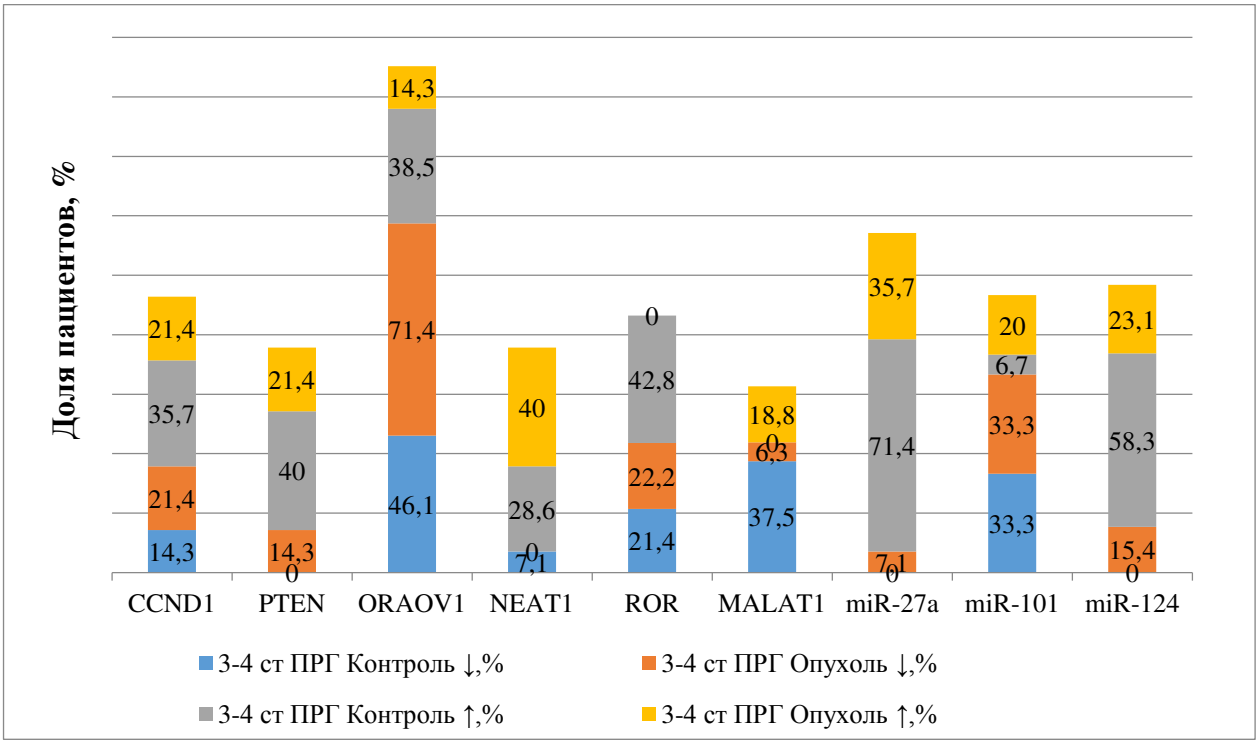


Рис. 15. Доля пациентов с ПРГ и контрольная группа 3-4 стадии (18 человек) изменяющейся экспрессией некодирующих РНК и белок-кодирующих генов, выраженное в процентах

Известны другие днРНК, имеющие прогностическую ценность. Так, днРНК ROR проявляет свойства онкогена при многих видах рака [124, 163]. В исследовании Zhang et al. показано, что ROR может значительно подавлять активности *P53*, разрушая взаимодействие с герегоненным ядерным рибонуклеопротеином I (являющегося РНК-связывающим белком, учавствующий в сплайсинге мРНК), посредством механизма репрессии трансляции. Кроме того, ROR находится под контролем *P53*, что означает, что уровень активности днРНК ROR увеличивается при индуцировании P53 [164]. Полученные нами результаты показали, что в опухолях 1-2 стадии наблюдается высокое

содержание днРНК ROR по сравнению с окружающими опухоль здоровыми тканями. Анализ индивидуальных значений экспрессии показал, что у 42,7% пациентов с 3-4 стадии в нормальном плоскоклеточном эпителии гортани уровень днРНК ROR также повышался.

Из рис. 15 видно, что у 18,8% в опухолях больных 3-4 стадии по сравнению с 8,3% в опухолях 1-2 стадии выявлено значимое увеличение экспрессии днРНК MALAT1 ($p<0,05$). Повышенная экспрессия MALAT1 приводит к активации клеточной миграции, пролиферации и инвазии, а также выступает важным регулятором апоптоза [165].

Нами был исследован также ряд микроРНК. Экстремальные значения содержания miR-27a у больных в 1-2 стадии наблюдались у 75% и были выше, чем у пациентов в 3-4 стадии (42,8%). Данная микроРНК значима при развитии ПРГ, поскольку ее высокий уровень коррелирует с плохим прогнозом у больных [140].

Сообщалось, что miR-101 участвует во многих биологических процессах, включая пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, лекарственную устойчивость, инвазию и метастазирование, влияющие на развитие различных онкологических заболеваний. [153]. MiR-101 является онкогеном при многих типах злокачественных новообразований, однако при ПРГ miR-101 может замедлять развитие опухолей [166]. Нами было показано, что экспрессия miR-101 в опухолях у 33% больных 3-4 стадии ПРГ была на низком уровне, в то время, как у больных 1-2 стадии лишь у 9,1% ($p<0,05$). В нашем исследовании экстремальная экспрессия miR-101 в опухолях 3-4 стадии была у 53,3% по сравнению с 27,3% больных 1-2 стадии. Таким образом, наблюдается более высокий уровень экспрессии онкосупрессора miR-101 у больных 3-4 стадии, что позволяет судить о нем, как о перспективном прогностическом маркере.

В ряде работ продемонстрировано подавление активности miR-124 в злокачественных новообразованиях. Также известно, что miR-124 ассоциирована с опухолевым ростом, формированием метастазов и неблагоприятным прогнозом. Следует отметить, что в ряде работ у больных ПРГ была указана ее роль как онкосупрессора [155, 167]. Нами показано, что в опухолях у 44,4% больных 1-2 стадии наблюдается увеличение экспрессии miR-124, и у 22,2% - снижение. Содержание miR-124 в окружающей опухоль ткани у 58,3% больных 3-4 стадии повышалось, а в опухолях той же группы – у 23,1%. Таким образом, число пациентов 3-4 стадии с

гиперэкспрессией miR-124 в опухолях было значимо ниже по сравнению с таковой группой у больных 1-2 стадии.

3.1.2. Индивидуальные различия в активности мРНК генов, днРНК и микроРНК у больных с ПРГ

Различия в активности микроРНК и днРНК у пациентов, наводят на мысль о важности индивидуального определения активности этих показателей для выбора терапевтической цели. На рис. 16 представлены индивидуальные данные по изучению показателей экспрессии между 1-2 и 3-4 стадии ПРГ: днРНК NEAT1, днРНК ROR, мРНК генов *PTEN* и *CCND1*, а также микроРНК miR-27a и miR-124, коррекция которых может быть использована для применения в персонифицированной терапии.

Анализ индивидуальной экспрессии днРНК NEAT1 и ROR показал, что их содержание существенно увеличивается у пациентов с 3-4 стадией ПРГ (рис. 16 а, б). Кроме того, в опухолях с более агрессивными стадиями заболевания (3 и 4) было обнаружено снижение экспрессии гена *PTEN*, что является хорошим прогностическим маркером для оценки ответа на радиотерапию (рис.16 в).

Функционирование *CCND1* как онкогена, стимулирующего пролиферативные процессы в клетках плоскоклеточного эпителия, приводит к необходимости исследования его содержания у больных. Нами показано, что в биоптатах у пациентов с 3-4 стадиями заболевания, уровень *CCND1* существенно выше по сравнению с группой контроля (рис. 16 г). Определение избыточной экспрессии *CCND1* поможет идентифицировать пациентов с неблагоприятным прогнозом и использовать этот показатель как прогностический.

Результаты свидетельствуют о том, что в биоптатах у пациентов с 3-4 стадиями заболевания, уровень *CCND1* существенно выше по сравнению с группой контроля (рис.16 г). Определение избыточной экспрессии *CCND1* поможет идентифицировать пациентов с плохим прогнозом и использовать этот показатель как прогностический.

Индивидуальные различия в экспрессии miR-27a показывают, что данная микроРНК значима при развитии ПРГ. (рис. 16 д).

Следовательно, получены данные о выраженных индивидуальных различиях по уровням экспрессии микроРНК и днРНК, что имеет огромное значение как для диагностико-прогностических заключений, так и подходов к индивидуальной терапии.

Изучение индивидуальных особенностей профиля РНК-соединений в биоптатах и биологических жидкостях может способствовать как ранней диагностике ПРГ, так и определению стадии и прогноза заболевания. Продемонстрированное в данной работе увеличение экспрессии генов *CCND1, ORAOV1*, днРНК NEAT1, MALAT1, ROR, микроРНК miR-21, miR-27a, miR-34, miR-101, miR-181a и снижение функциональной активности изученных онкосупрессоров свидетельствует о дисрегуляции систем сохранения стабильности генома и пролиферации, приводящих к развитию ПРГ. Коррекция содержания днРНК и микроРНК в опухолях, может играть ключевую роль в подходах к специфическим особенностям терапии [168].

Повышение и снижение экспрессии генов при ПРГ может влиять на устойчивость к химиотерапии или радиотерапии. В связи с этим важным является разработка комбинированной терапии, включающей в себя направленное ингибирование или активацию функционирования генетических детерминант.

Полученные нами данные показали значительные отличия в экспрессии разных генов при одной и той же стадии заболевания в зависимости от особенностей индивида. Это необходимо учитывать при оценке прогностической значимости исследуемых показателей и их возможном использовании как мишеней для терапии.

Полученные данные свидетельствуют, во-первых, об использовании уровней экспрессии генов и некодирующих РНК как показателей течения онкологического заболевания и его прогноза; во-вторых, эти подходы могут быть использованы как критерии оценки развития радиоиндуцированных опухолей, особенностей их течения, раннего прогноза и, возможно, эффективности лечения, в том числе радиотерапии.

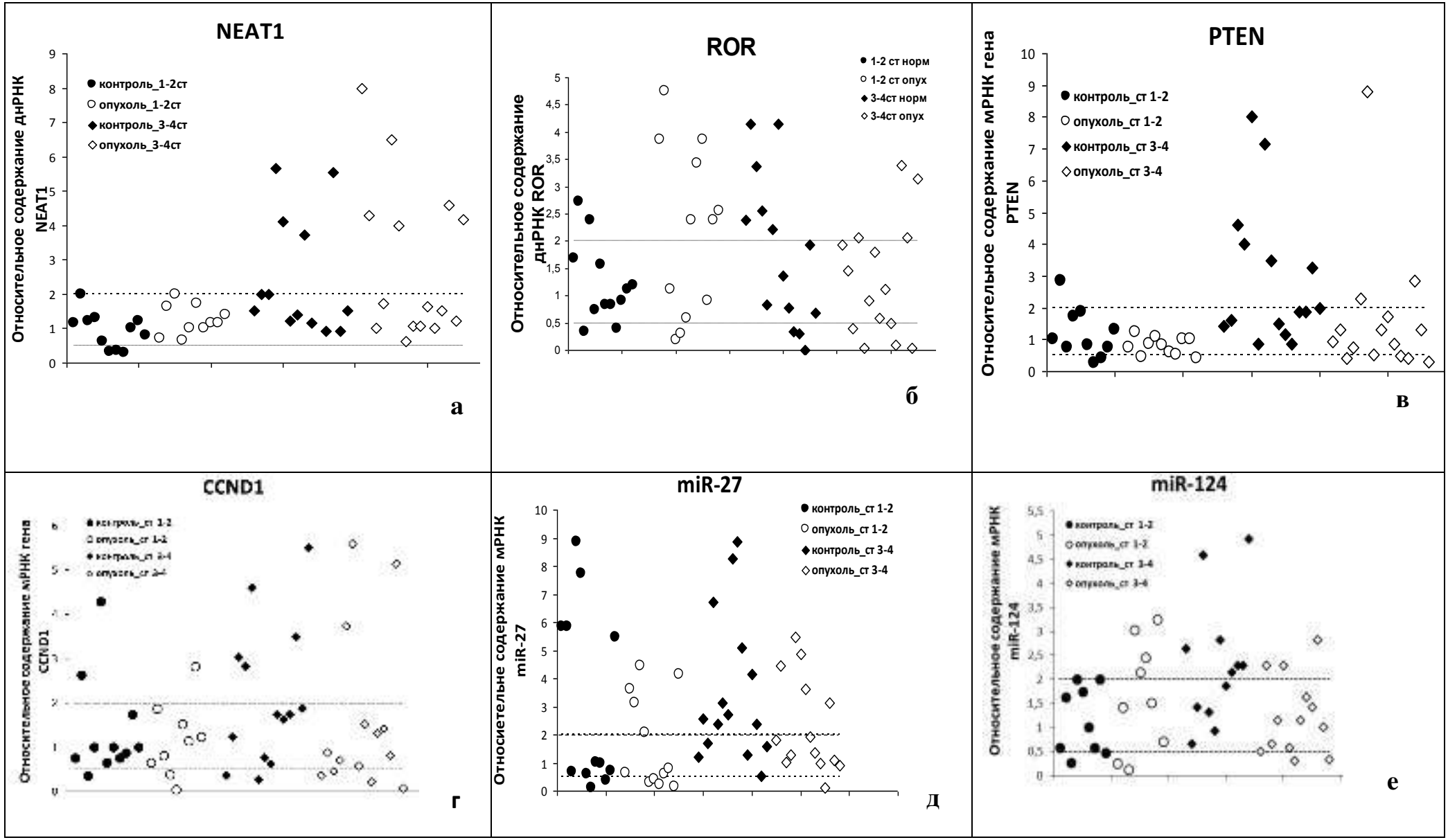


Рис.16. Индивидуальные значения относительного содержания NEAT1 (а), ROR (б), PTEN (в), CCND1 (г), miR-27a (д), miR-124 (е) в опухолях пациентов и контрольной группе пациентов 1-2 и 3-4 стадии ПРГ

3.2. Различия в активности генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека при действии малых и высоких доз радиации

Изменение профиля экспрессии микроРНК и днРНК после воздействия ИИ диктуют важность их исследования при формировании АО [77]. Более глубокие исследования молекулярных механизмов АО необходимы для оценки эффективности действия МДР с целью защиты нормальных клеток пациентов при ЛТ, и, на этой основе, выявление показателей, характеризующих формирование защитных механизмов.

Цель настоящего исследования – сопоставить действие МДР на функциональную активность генов *P53*, *NFkB* и ряда других генов, активность микроРНК и днРНК в нормальных лимфоцитах и клетках Т-лимфобластного лейкоза человека (линия Jurkat) при развитии АО *[результаты данного раздела ранее опубликованы в работе «Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека» Михайлов В.Ф., и др., Салеева Д.В.]*.

3.2.1. Выживаемость клеток

На рис. 17 представлены результаты оценки выживаемости нормальных лимфоцитов и клеток злокачественной линии Jurkat. Так через 20 часов после облучения клеток линии Jurkat в дозе 5 Гр можно отметить статистически значимое снижение их выживаемости. Однако, стоит заметить, что радиорезистентность лимфобластных клеток не увеличивалась при предварительном облучении в малой дозе, что отражается в отсутствии различий в выживаемости клеток между двумя группами: с комбинированным облучением (0,1+5 Гр) и без него (5 Гр).

Для лимфоцитов здоровых доноров наблюдалась иная картина. Так, были отмечены существенные различия выживаемости лимфоцитов между контрольной и исследуемыми группами. В то же время, статистически значимо отличается выживаемость нормальных клеток в группе с предварительным облучением в малой дозе и последующим воздействием в высокой (0,1+5 Гр) от группы с облучением только в дозе 5 Гр. Данный эксперимент приводит к выводу о формировании АО в лимфоцитах здоровых доноров, тогда как в злокачественных клетках линии Jurkat с мутантным геном *P53* этого эффекта не наблюдалось.

Это связано с накоплением структурных нарушений генов в клетках линии Jurkat. В частности, исследуемые клетки отличаются от нормальных присутствием стоп-кодонов в генах онкосупрессорах *P53* и *MSH2*, в также большим числом мутаций в гене *BAX* [169]. Стоит отметить, что наличие стоп - кодонов в шестом экзоне гена *P53* приводит к формированию его неполноценной структуры, нереализующей процессы защиты клетки при действии повреждающих факторов, и, как следствие к трансляции онкогенной формы белка p53, препятствующей реализации адаптивной программы и изменяющей экспрессию генов, формирующих ответ на стресс - воздействия.

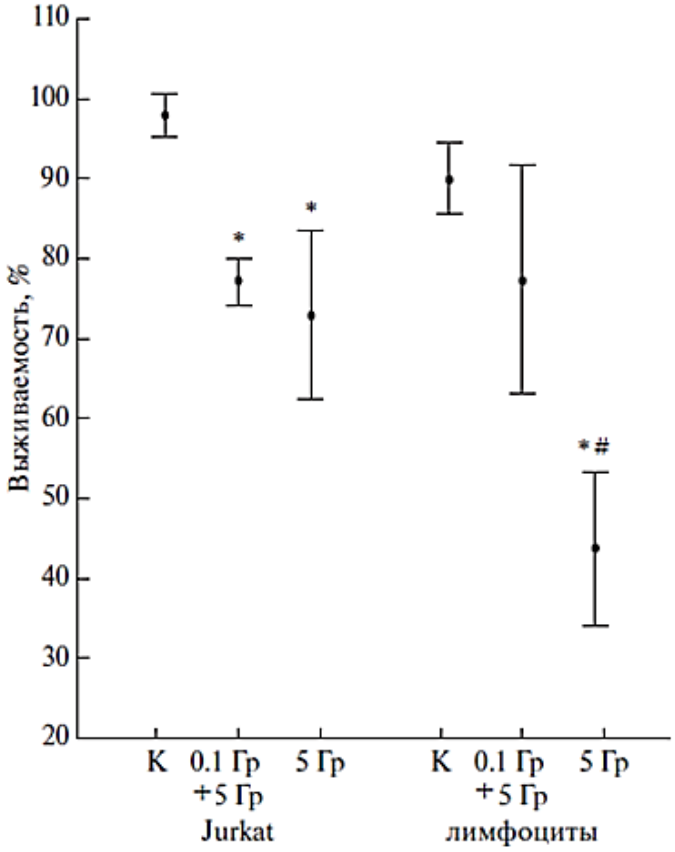


Рис. 17. Выживаемость лимфоцитов и клеток линии Jurkat в контроле (К), через 20ч после однократного воздействия радиации в дозе 5 Гр (5 Гр), а также комбинированного облучения в дозах 0,1 Гр и 5 Гр через 4 ч (0,1 Гр+5Гр).

*Даны средние значения и их стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Различия статистически значимы: *между интактными (К) и облученными клетками (p<0,05);*
 # между группами (0,1 Гр+5Гр) и 5Гр (p<0,05).

3.2.2. Влияние малых доз ионизирующей радиации на активность генов *P53* и *NFkB* в клетках

Транскрипционные факторы P53 и NFkB являются неотъемлимыми звеньями в формировании АО. Применение их ингибиторов (пифитрина-α, BAY11-7082) показало способность либо подавлять, либо ослаблять формированиеАО [170]. Особенность ТФ P53 и NFkB заключается в возможности воздействия на промоторную часть своих генов-мишеней, что приводит к активации экспрессии ряда генов, необходимых для реализации P53- и NFkB-зависимых патологических путей. В то же время регуляторные РНК способны модифицировать экспрессию белков, побуждающие транскрипцию ряда генов.

Для исследования были выбраны показатели, позволяющие оценить изменения функционирования P53- и NFkB -систем в клетках, включающие мРНК белок -синтезирующих генов, микроРНК и днРНК, взаимодействующие с *P53* и *NFkB*.

В табл. 3 представлены активности генов в исследуемых группах клеток через 1 и 4 часа после воздействия 0,1 Гр рентгеновского излучения. Ген *PTEN* является транскрипционной мишенью *P53*. Связь Sp1 с P53 обусловлена наличием Sp1-истощения и эктопической экспрессии Sp1, что оказывало выраженное влияние на часть P53-регулируемых генов [171]. *RhoA, cdc42, IRAK1, IAP1* и *IL6* являются мишенями ядерного фактора NFkB. Через 1 час после воздействия ИИ (0,1 Гр) на лимфоциты наблюдалось статистически значимое увеличение содержания мРНК гена *P53*, и снижение содержания мРНК генов *RhoA, cdc42* и *IL6* (табл. 3).

Таблица 3. Содержание мРНК белок-кодирующих генов в контроле (К) и через 1 и 4 часа после воздействия 0,1 Гр рентгеновского излучения на лимфоциты и клетки линии Jurkat

мРНК гена	Содержание мРНК							
	Лимфоциты				Jurkat			
	Через 1ч		Через 4 ч		Через 1ч		Через 4 ч	
	К	0,1Гр	К	0,1Гр	К	0,1Гр	К	0,1Гр
RhoA	1,00 [0,93–1,14]	0,57* [0,46–0,61]	1,02 [0,54–1,37]	1,07 [0,81–1,86]	1,01 [0,37–1,68]	0,68 [0,13–0,78]	1,01 [0,37–1,68]	1,08 [0,79–1,37]
cdc42	1,00 [0,81–1,23]	0,57* [0,46–0,66]	1,00 [0,59–1,39]	1,1 [0,78–2,37]	1,00 [0,57–2,46]	0,76 [0,16–1,00]	1,00 [0,57–2,46]	1,19 [0,81–1,52]
Sp1	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	1,00 [0,87–1,00]	1,21 [0,76–1,41]	1,00 [0,87–1,00]	1,00 [1,00–1,41]

PTEN	1,00 [0,93–1,07]	1,07 [1,00–1,51]	1,05 [0,68–1,79]	0,9 [0,9–0,97]	1,00 [0,93–1,41]	1,19 [0,87–1,23]	1,00 [0,93–1,41]	1,15 [1,07–1,41]
P53	1,00 [0,95–1,04]	1,62* [1,14–1,74]	1,01 [0,90–1,15]	1,04 [0,97–1,19]	1,0 [0,87 – 1,07]	0,77 [0,71–0,81]	1,00 [0,87–1,07]	0,65a [0,62–0,75]
NFkB(p65)	1,0 [0,89–1,07]	1,07 [1,00–1,15]	1,00 [0,87–2,28]	1,07 [1,07–1,74]	1,00 [0,76–1,15]	1,68* [1,32–2,14]	1,00 [0,76 – 1,15]	0,73 [0,57–0,87]
IAP1	1,0 [0,84–1,15]	0,97 [0,90–1,37]	1,0 [0,93–1,20]	1,07 [1,0–1,15]	1,00 [0,90–1,11]	1,04 [0,84–1,48]	1,0 [0,9–1,11]	0,48* [0,37–0,64]
IL6	1,0 [1,00–1,00]	0,71* [0,44–0,87]	1,0 [0,52–2,09]	0,87 [0,25–1,15]	1,00 [0,87–1,00]	3,25* [2,94–4,87]	1,00 [0,90–1,07]	1,13 [0,93–1,41]
IRAK1	1,0 [0,93–1,15]	1,0 [0,81–1,74]	1,01 [0,74–1,19]	0,76 [0,66–0,87]	1,01 [0,84–1,11]	0,90 [0,78–1,04]	1,01 [0,84–1,11]	0,93 [0,84–1,46]

***Примечание**. Данные представлены в виде медиан и квартилей. Значения медианы в контрольной группе приняты за 1, а значения медианы в экспериментальных группах показывают во сколько раз уровень экспрессии гена выше или ниже относительно контрольной группы.*

**-Различия между интактным контролем и облученными клетками статистически значимы (p <0,05).*

Как видно, в этот период времени отмечалось увеличение транскрипции гена *P53* и снижение функциональной активности гена *NFkB* в нормальных клетках здоровых доноров. После повторного облучени в дозе 5 Гр (через 4 часа) все мРНК белоксинтезирующих генов возвращались к уровню интактного контроля. Однако в клетках Jurkat наблюдалась иная картина. Через 1 час после воздействия ИИ в малой дозе (0,1 Гр) увеличивалась активность одной из субъединиц гена *NFkB* - p65, и уровня его гена-мишени *IL6*. Через 4 часа выявлено снижение экспрессии генов *P53*, *NFkB*(p65) и *IAP1*. Содержание зрелых микроРНК и днРНК через 1 и 4 часа после воздействия 0,1Гр излучения на лимфоциты и клетки линии Jurkat представлено в табл. 4.

Таблица 4. Содержание зрелых микроРНК и днРНК в контроле (К) и через 1 и 4 часа после воздействия рентгеновского излучения (0,1 Гр) на лимфоциты и клетки Jurkat

РНК	Содержание мРНК							
	Лимфоциты				Jurkat			
	Через 1ч		Через 4 ч		Через 1ч		Через 4 ч	
	К	0,1Гр	К	0,1Гр	К	0,1Гр	К	0,1Гр
днРНК ROR	1,00 [0,95–1,31]	1,52 [1,23–1,62]	1,02 [0,69–1,42]	0,81 [0,75–1,00]	1,02 [0,78–1,36]	1,34 [1,03–1,68]	1,00 [0,78–1,36]	1,11 [0,73–1,19]
днРНК MALAT1	1,00 [0,53–1,04]	1,41* [1,12–1,23]	1,00 [0,82–1,11]	0,84 [0,64–0,97]	1,00 [0,81–1,74]	1,81 [1,23–2,30]	1,00 [0,81–1,74]	1,57 [1,41–2,0]
днРНК GAS5	1,00 [0,71–1,07]	1,41* [1,23–1,62]	1,00 [0,52–1,37]	0,66 [0,47–0,81]	1,02 [0,66–1,51]	1,03 [1,00–1,15]	1,02 [0,66–1,52]	0,90 [0,87–1,15]
днРНК HOTAIR	1,00 [0,38–1,23]	2,29 [0,66–4,00]	1,1 [0,44–3,84]	1,0 [0,35–4,81]	1,02 [0,66–1,51]	0,93 [0,57–1,23]	1,02 [0,65–1,52]	1,15 [0,93–1,23]
днРНК NEAT1	1,00 [0,57–1,07]	0,81 [0,67–1,33]	1,06 [0,68–2,02]	1,7 [0,75–2,14]	1,00 [0,73–1,37]	1,94* [1,68–2,38]	1,00 [0,73–1,36]	1,46 [1,36–1,80]
miR-107	1,00 [0,95–1,04]	1,15 [0,76–1,32]	1,00 [0,3–2,64]	1,14 [0,25–8,57]	1,01 [0,30–1,57]	0,02* [0,02–0,02]	1,00 [0,29–1,56]	0,12* [0,12–0,14]
miR-181a	1,01 [0,71–1,33]	0,37* [0,35–0,57]	1,00 [0,56–1,95]	1,00 [0,81–1,23]	1,00 [0,61–1,07]	0,11* [0,04–0,31]	1,01 [0,61–1,07]	0,78 [0,13–0,93]
miR-27a	1,00 [0,71–1,07]	0,41 [0,27–1,04]	1,07 [0,68–1,46]	1,02 [0,56–1,43]	1,00 [0,76–1,51]	1,23 [1,00–1,41]	1,00 [0,75–1,52]	1,37 [0,87–2,00]

Другой мишенью гена *P53* является miR-107 [172]. Кроме того, на экспрессию этой микроРНК может влиять NFkB-путь через толл-подобный рецептор 4 (TLR4) [173]. В то же время, ген *P53* сам является потенциальной мишенью miR-181a и miR-27a [174]. ДнРНК NEAT1 подавляет активность *P53*, но сам ген *P53* сопособен активировать синтез NEAT1 [175]. Подобные антагонистичные отношения показаны для *P53* и днРНК MALAT1, а также для ДнРНК GAS5 и *NFkB* [176]. Это связано с тем, что ДнРНК GAS5 имеет отрицательную обратную регуляцию с miR-21, и, как следствие, с *NFkB*.

Из данных в табл. 4 видно увеличение содержания днРНК MALAT1 и GAS5, а также снижение экспрессии miR-27a и miR-181a в лимфоцитах здоровых доноров через 1 час после облучения в малой дозе (0,1 Гр), а через 4 часа – нормализация этих показателей. Кроме того через 1 час после облучения увеличивается уровень активности днРНК NEAT1 и снижается экспрессия miR-181a и miR-107 в клетках линии Jurkat. Через 4 часа после воздействия комбинированного облучения в дозе 0,1 Гр и

последующего облучения (5 Гр) экспрессия miR-107 сохранялась на сниженном уровне. Таким образом, анализ данных, представленных в табл. 3 и 4, приводит к выводу о том, что при воздействии облучения в малой дозе реакция нормальных лимфоцитов и клеток линии Jurkat различна. Так, в первый час после облучения отмечается активация P53-системы и подавление активности NFkB-ответа в лимфоцитах. Через 4 часа эти показатели восстанавливаются. В клетках Т-лимфобластной лейкемии наблюдаются противоположные изменения, сопровождающиеся активацией NFkB-системы через 1 час после облучения.

3.2.3. Влияние малой дозы на изменения активности генов *P53* и *NFkB* в клетках через 20 часов после облучения в дозе 5 Гр

На рис. 18 представлены результаты изменения активности генов в лимфоцитах и клетках Jurkat в группах 5 Гр и (0,1 Гр + 5 Гр) через 20 часов после облучения.

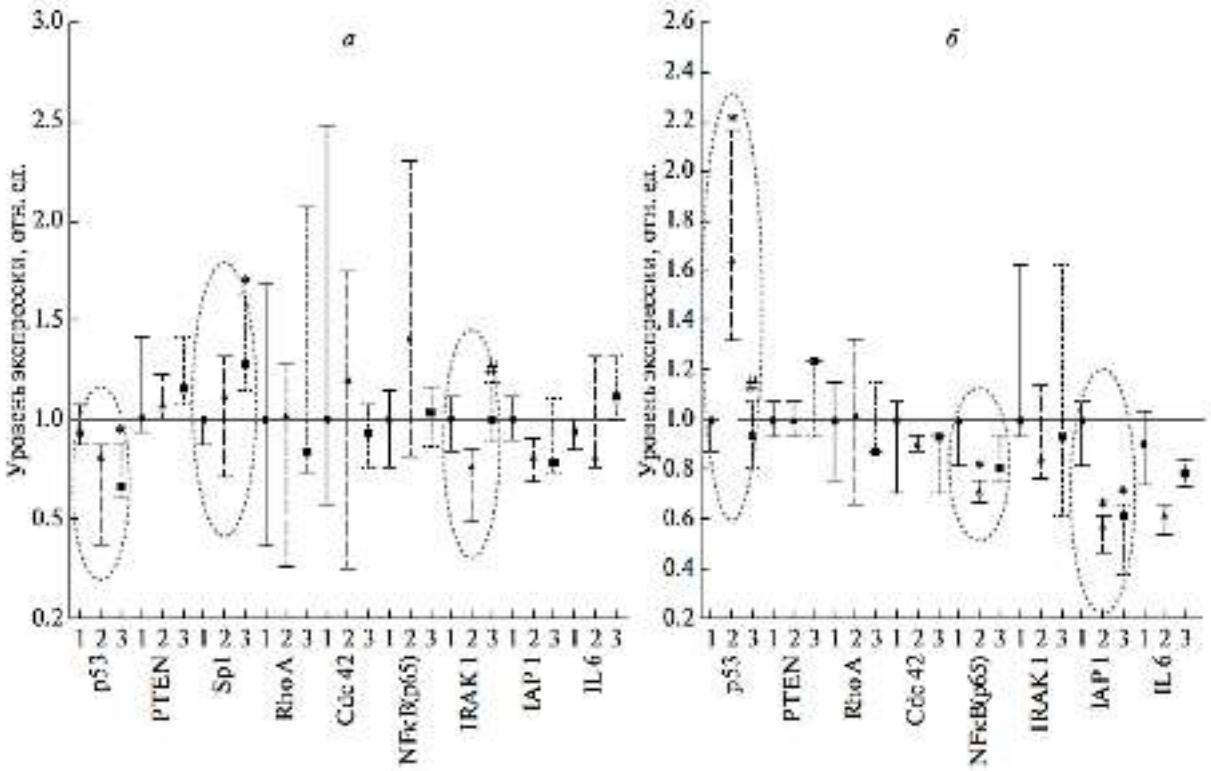


Рис.18. Изменение содержания активности генов в клетках линии Jurkat (а) и нормальных лимфоцитах (б) в контроле (1) и через 20 часов после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия в дозе 0,1 Гр а затем (через 4 часа) 5 Гр (3).

Объяснения к рис. 18-20: данные представлены в виде медиан и квартилей. Значения медианы в контрольных группах приняты за 1, а значения медианы в экспериментальных группах показывают во сколько раз через 20 ч после облучения клеток уровень экспрессии гена выше или ниже относительно контрольной группы.

** - Различия статистически значимы между интактным контролем и облученными клетками*

 # - Различия статистически значимы между группами (0,1 Гр + 5 Гр) и 5 Гр (p < 0,05). Овалом выделены результаты у показателей, имеющих статистически значимые различия между исследуемыми группами.

После облучения в дозе 5 Гр в лимфоцитах отмечается повышение активности гена *P53* и снижение экспрессии генов *NFkB*, *IAP1* и *IL6*. В лимфоцитах в группе (0,1 Гр

+ 5 Гр) экспрессия генов, за исключением *IAP1*, не отличалась от уровня контрольных значений. Таким образом, отмечается снижение активности NFkB -ответа в лимфоцитах здоровых доноров после воздействия ИИ в повреждающей дозе. Формирование АО связано с вовлечением P53 зависимой системы сохранения генома, что подтвеждается статистически значимыми изменениями содержания гена *P53* в группах 5 Гр и (0,1 Гр + 5 Гр) (рис. 18б). Аналогичный эксперимент на клетках линии Jurkat показал подавление активности гена *P53* и увеличение активности гена *Sp1* в группе (0,1 Гр + 5 Гр), а также выявил статистически значимые различия между группами 5 Гр и (0,1 Гр + 5 Гр) по показателю мРНК гена *IRAK1* (рис. 18а). На рис. 19 представлены результаты исследований экспрессии днРНК в клетках линии Jurkat (рис. 19а) и нормальных лимфоцитах (рис. 19б) через 20 часов после действия радиации.

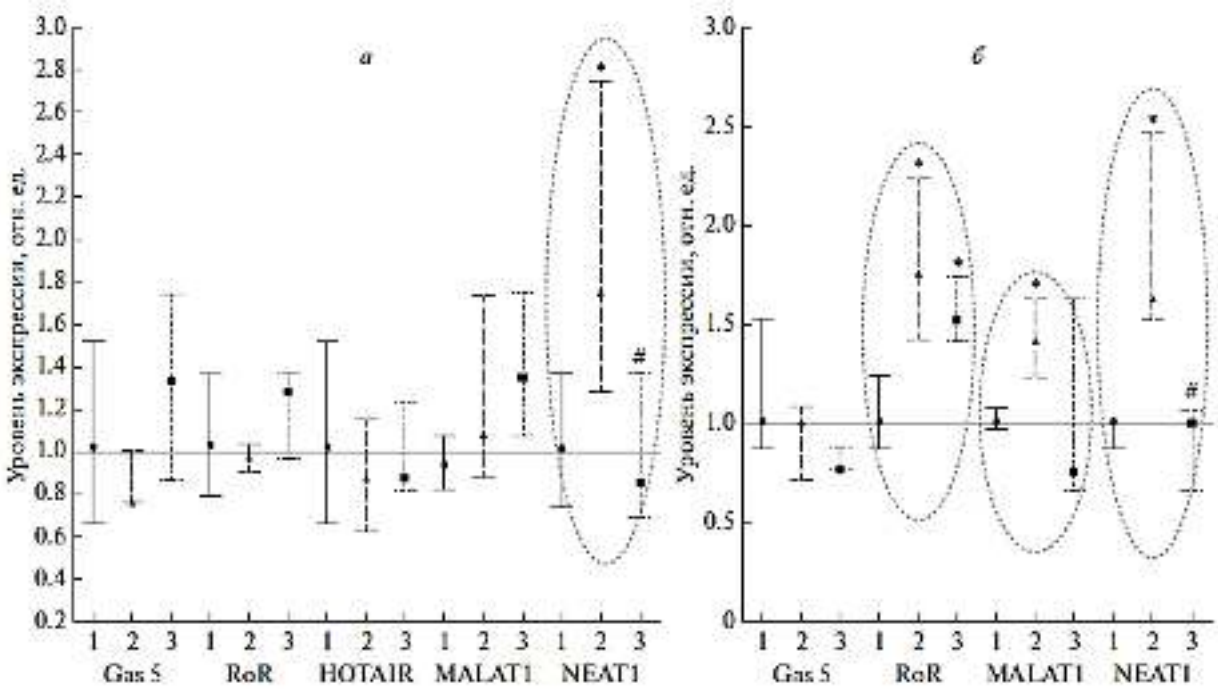


Рис.19. Изменение содержания днРНК в клетках линии Jurkat (а) и нормальных лимфоцитах (б) в контроле (1) и через 20 ч после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия 0,1 Гр, а затем (через 4) ч 5 Гр (3).

Объяснения те же, что к рис. 18.

На рис.19б показано увеличение экспрессии днРНК RoR, MALAT1 и NEAT1 в лимфоцитах в группе 5 Гр. Тогда как в группе (0,1 Гр + 5 Гр), где наблюдался АО, отмечается повышение активности лишь днРНК RoR. Экспрессия только этой днРНК увеличивается в клетках линии Jurkat (рис. 19а).

На рис. 20 представлены результаты изменения экспрессии микроРНК в клетках линии Jurkat (рис. 20а) и нормальных лимфоцитах (рис. 20б) через 20 часов после действия радиации. Различия в экспрессии показателей между исследуемыми группами 5 Гр и (0,1 Гр + 5 Гр) проявляются только в лимфоцитах. Так, содержание зрелой miR-181a в группе (0,1 Гр + 5 Гр) было выше, чем в группе 5 Гр, а miR-107 – ниже (рис. 20б).

Таким образом, результаты данного исследования показали «присутствие» АО в лимфоцитах здоровых доноров, что сопровождалось, активацией P53-системы после действия МДР. Эти процессы связаны с увеличением экспрессии как самого гена *P53* (на транскрипционном уровне), так и микроРНК miR-27a и miR-181a, мишенью которых является ген *P53* (на посттранскрипционном уровне). Кроме того, увеличивалось содержание днРНК Gas5, поддерживающей функционирование *P53*.

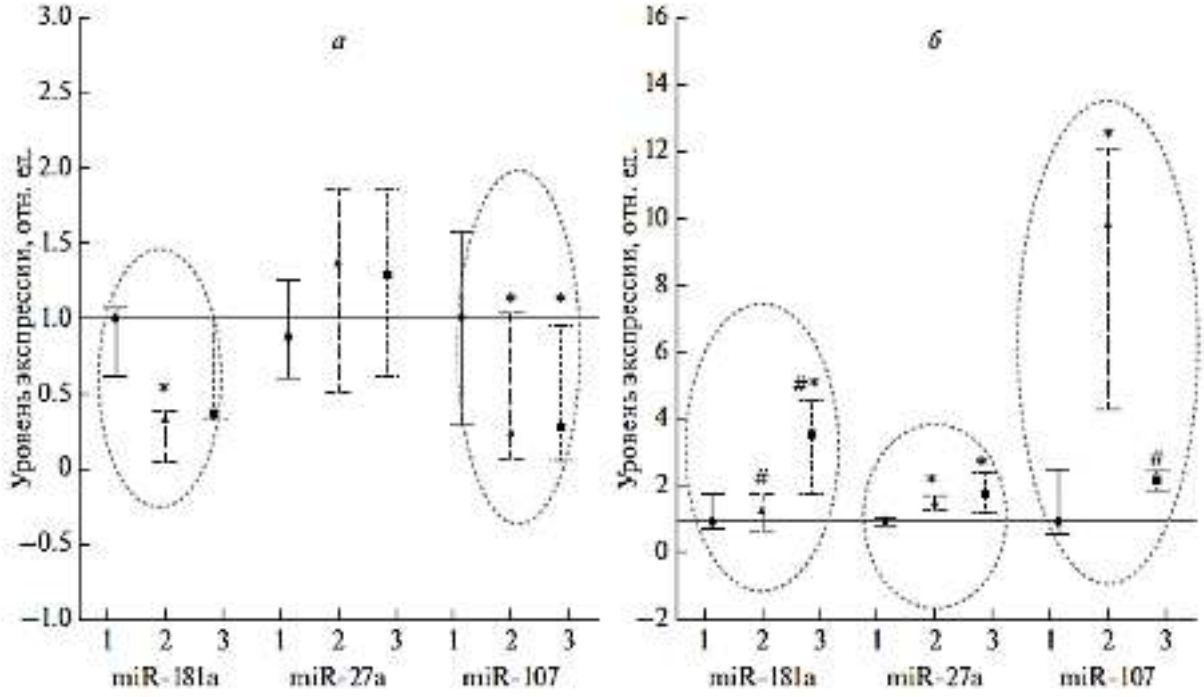


Рис. 20 . Изменение содержания зрелых miR в клетках линии Jurkat (а) и нормальных лимфоцитах (б) в контроле (1) и через 20 часов после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия 0,1 Гр и через 4 часа – 5 Гр (3).

Объяснения те же, что к рис. 18.

С другой стороны формирование АО связано со снижением активности NFkB - системы в ответ на действие МДР, что проявляется в снижении мРНК генов - мишеней ТФ NFkB, а именно мРНК генов *RhoA*, *cdc42* и *IL6* и увеличением содержания днРНК Gas5. Пониженная экспрессия гена *NFkB*(*p65*) сохранялась и через 20 часов после

облучения в дозе 5 Гр. В отличие от лимфоцитов, в клетках линии Jurkat, не проявляющих АО после воздействия малой дозы 0,1 Гр, не отмечалось активации системы P53. Наоборот, наблюдалось повышение экспрессии гена *NFkB(p65)* и мРНК его мишени гена *IL6*. Различий исследуемых показателей между группами 5 Гр и (0,1 Гр + 5 Гр) через 20 часов после облучения в дозе 5 Гр, за исключением днРНК NEAT1, также не обнаруживалось.

Влияние МДР на организм человека приобретает особое значение в последнее время, в связи с распространением медицинских процедур, в частности, КТ. Пациента могут обследовать 2-3 в месяц, что, естественно, может быть небезопасным, особенно для тех, кто у кого повышена чувствительность к действию радиации, связанная, например, с особенностями генетического полиморфизма и другими факторами. В отдаленные сроки действие МДР может способствовать развитию ряда заболеваний человека. Так в экспериментальной группе обследованных пациентов у 280 из 454 индивидов показано, что действие ИИ в малой дозе может являться фактором риска развития сердечнососудистых патологий [177]. И кроме того, может вызывать депрессии у людей [178].

Эти факты могут быть связаны с разными причинами. Во-первых, разные авторы в понятие МДР вкладывают различные уровни облучения (от 0,05 до 0,2 Гр) [179]. Во-вторых, продолжительность воздействия МДР и его характеристики в опытах существенно отличались. В-третьих, генотип некоторых людей и особенности их социального статуса в популяции по признаку радиочувствительности существенно различаются, что может способствовать проявлению одной или другой патологии у отдельных индивидов. С другой стороны, действие МДР создает резистентность к высоким дозам радиации – АО, который характерен для разных форм живого и может регистрироваться по ряду критериев: выживаемость, генные мутации, микроядерный тест и др [53, 59, 77, 180].

Отсутствие формирования АО в злокачественных клетках привлекает внимание для возможности применения МДР для коррекции методов ЛТ. Таким образом, ряд авторов предлагает использование действия МДР для стабилизации функционирования нормальных, окружающих опухоль клеток, при лечении пациентов со злокачественными новообразованиями [38, 39, 181].

Ряд генов и некодирующих РНК, исследованных в данном эксперименте, был выбран на основе литературных данных и собственных экспериментов. Важно, что изменение экспрессии генов и некодирующих РНК может рассматриваться как некие молекулярные показатели, и кроме того, могут служить маркерами прогноза и эффективности терапии, а также риска возникновения осложнений, сформировавшихся в результате облучения [182]. Как видно из данного эксперимента, АО формировался (по показателю выживаемости) в лимфоцитах доноров, тогда как в клетках Jurkat (с измененным геномом) – нет.

Анализ экспрессии генов (*P53, PTEN, RhoA, Cdc42, NFkB, IAP1, Il6, IRAK1*) в нормальных и злокачественных клетках выявил статистически значимые различия. Особый интерес представляет исследование активности некодирующих РНК. Биоинформатический анализ показывает существование множества мРНК, которые являются мишенями микроРНК, что отражается в ингибировании активности генов. Под влиянием различных факторов (стресс, радиация, инфекционные агенты) происходит взаимодействие микроРНК с генами-мишенями. Так, после воздействия МДР в нормальных клетках (лимфоцитах) обнаружено изменение активности miR-27a и miR-181a, а также их мишеней, что может отражаться на резистентности клеток в ответ на действие радиации [174].

В последнее время днРНК отводится большая роль в процессе развития различных патологий. Потенциал этих некодирующих молекул крайне велик в диагностике заболеваний. А расширение спектра изучения днРНК может позволить выявить комплекс показателей не только для оценки способности клеток реагировать на действие радиации, но и в качестве возможных маркеров формирования АО.

Важность в различии ответа нормальных и злокачественных клеток на действие излучения может рассматриваться с точки зрения защиты нормальных клеток, окружающих опухоль, от действия ВДР, применяемых при ЛТ. Это поможет снизить риски ранних осложнений, таких как ректиты при раке простаты, фиброзы при раке груди, циститы. В опубликованной ранее работе показано, что повышение экспрессии miR-21 до и после ЛТ может являться показателем развития цистита при радиотерапии рака предстательной железы. Активность других исследованных микроРНК (34a, -125b, Let-7a, -145, -16z) не отличалась от уровня контроля в крови этих же пациентов как до, так и после лечения [182].

Таким образом, проведенный эксперимент демонстрирует возможность использования МДР для оптимизации методов лечения злокачественных новообразований, создавая повышенную радиорезистентность нормальных тканей, окружающих опухоль, основанную на формировании АО в нормальных клетках и его отсутствия в опухолевых.

3.3 Активность генов и некодирующих РНК в динамике формирования опухолей после облучения мышей

3.3.1. Роль некодирующих РНК - регуляторов генной активности в ответе на радиационное воздействие в малых дозах у мышей, инокулированных карциномой Льюиса

Одним из основных направлений радиобиологических исследований является оптимизация ЛТ при онкопатологиях и поиск биомаркеров для ранней диагностики опухолей. Для решения первого вопроса актуальным является использование МДР с целью снижения радиорезистентности опухолевых клеток, уменьшения роста опухоли и повышение радиоустойчивости тканей, окружающих опухоль. Для решения второго вопроса исследуется профиль экспрессии генов и их регуляторов - некодирующих РНК, принимающих участие в опухолевом процессе. Данные, полученные при исследовании, проведенном на мышах, указывают на вовлеченность определенных структур (генов, некодирующих РНК) в предраковом состоянии. Это может быть использовано для поиска биомаркеров при развитии конкретных опухолей. Такие показатели в дальнейшем могут служить мишенью для специфической терапии.

Если в нормальных клетках после предварительного облучения МДР развивалась устойчивость к ВДР, что выражалось в повышенной выживаемости, снижении числа индуцированных разрывов ДНК, генных и хромосомных мутаций, что является проявлением АО, то в большинстве злокачественных клеток АО не формировался. Считают, что в формирование АО вовлекается система ATM-сигналинга, а также ряд других механизмов. Вместе с тем ключевую роль при действии МДР играет повышение иммунного статуса, который даже способствует ингибированию роста опухолей [19, 179].

3.3.1.1. Влияние МДР на динамику формирования опухолей у мышей, инокулированных карциномой Льюиса

На рис. 21 в динамике представлены усредненные результаты изменения объема инокулированной опухоли в группах необлученных и облученных 4х-кратно в МДР мышей.

Как видно из рис. 21, рост опухоли до 20-х суток в обеих группах происходит абсолютно одинаково, а затем начинается постепенное замедление роста в группе

облученных мышей, переходящее после 28 суток на плато у обеих групп, но с выраженной тенденцией на сниженном уровне в группе с облучением.

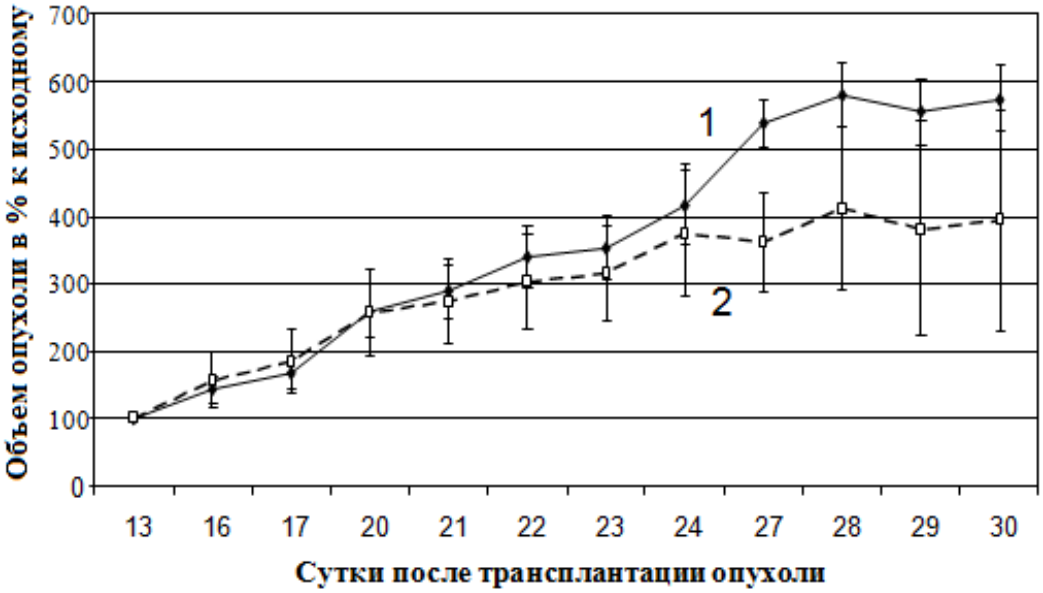


Рис. 21. Динамика роста карциномы Льюиса в группах необлученных (1) и облученных в МДР (2) мышей
По оси абсцисс представлены сутки после трансплантации опухоли, по оси ординат - объем опухоли (% к исходному объему на 13-е сутки, когда измерение становится возможным).

Чтобы охарактеризовать количественно различия в динамике роста опухоли в сравниваемых группах необлученных и облученных в малых дозах мышей, был проведен регрессионный анализ сравниваемых кривых. На рис.22 представлены регрессионные кривые роста опухолей, их аналитические выражения и корреляционные оценки в интервале 13-28 сутки после перевивки.

На рис. 22 видно, что линейная регрессия значимо аппроксимирует представленные на графике усредненные оценки размеров опухоли для обеих групп мышей. Также видно, что наклон кривой 2 снижен по сравнению с кривой 1, что правомерно отнести на счет 4х-кратного воздействия в МДР. Количественно тормозящее действие облучения в МДР можно оценить по отношению коэффициентов регрессий, отражающих скорость роста в относительных единицах (% увеличения за сутки объема опухоли от исходного измерения, принятого за 100). Таким образом, скорость роста в облученной группе составляет от аналогичного показателя в необлученной группе: (314,9/410, 7)*100 = 76,7%.

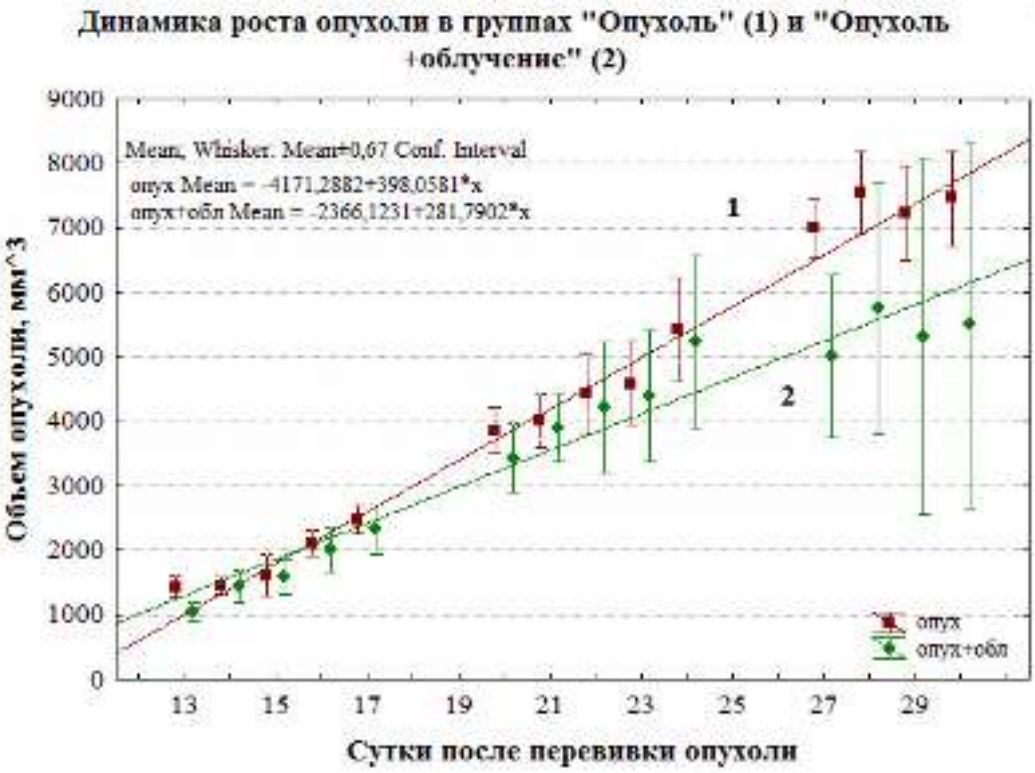


Рис. 22. Регрессионный анализ динамики роста опухоли в группах необлученных (1) и облученных (2) мышей.
По оси абсцисс представлены сутки после трансплантации опухоли, по оси ординат - объем опухоли мм^3.

Учитывая, что облучение происходило в интервале 13-21 суток после трансплантации опухоли и фактическое торможение роста имело место после окончания курса облучения, регрессионный анализ динамики роста был дополнительно применен к периоду 21-28 суток (рис. 23).

На рис 23 видно, что усредненные результаты измерений объема опухоли в обеих группах значимо аппроксимируются линейными зависимостями. Количественное соотношение роста опухоли в облученной группе мышей по отношению к необлученной группе составляет (251,4/483,2)*100 = 52 %.

В отношении показателя выживаемости различий между группой «Опухоль» и группой «Опухоль+облучение» отмечено не было. Средняя продолжительность жизни в первом случае составила 30,6 суток после трансплантации опухолевых клеток, а во втором – 31,3 суток.

Полученный материал из-за небольшого количества животных не дает возможности констатировать увеличение продолжительности жизни. Однако, в литературе имеется большое число публикаций, на разных представителях животного

мира, начиная от насекомых и заканчивая человеком, об увеличении этого показателя после применения МДР или при проживании людей в регионах с повышенным фоном радиации [183].

Рис. 23. Регрессионный анализ кривых роста опухоли в группах необлученных (1) и облученных (2) мышей в интервале 20-28 суток после трансплантации опухолевых клеток.
По оси абсцисс представлены сутки после трансплантации опухоли, по оси ординат - объем опухоли мм^3.

3.3.1.2. Динамика изменения активности генов и некодирующих РНК у мышей с трансплантированной карциномой Льюиса

Нами были исследованы две основные системы, имеющие первую линию защиты при повреждении клеток ИИ – P53-система сохранения стабильности генома и NFkB – система воспалительного ответа. Были проанализированы изменения экспрессии генов, днРНК и микроРНК, вовлеченные в каскад реакций, запускаемых ИИ.

В нашем исследовании после фракционированного облучения мышей отмечалась значимая положительная корреляция между генами *P53* и *NFkB* и их мишенями. Замечено, что после двух облучений изменения активности генов еще не так выражены.

Воздействие ИИ на клетку в зависимости от дозы можно рассматривать по-разному. Высокие дозы ИИ обладают противоопухолевым эффектом, ингибируя пролиферацию злокачественных клеток, индуцируя двухцепочечные разрывы ДНК. С другой стороны, МДР имеют защитный эффект и способны активировать иммунную систему организма, формируя АО [184, 185].

На основании результатов, полученных рядом авторов, исследуемые нами показатели можно разделить на две группы (табл. 5): гены и их регуляторы, несущие функцию онкосупрессоров (подавляющих рост опухоли) и онкогенов (активирующих рост опухолей).

Таблица 5. Гены, днРНК и микроРНК, изученные в данном эксперименте.

Онкогены	**Онкосупрессоры**
NFkB(p50)	*P53*
NFkB(p65)	*PTEN*
TNFa	*p38α*
G-CSF	PINT
Cyclin E2	DINO
IAP1	lncp21
IAP2	
IkBa	
iNOS	
TAL1	
CTCF	
MALAT1	
NEAT1	
miR-21	

В нашем исследовании была проанализирована активность онкогенов и онкосупрессоров в различных органах мышей в динамике на 14 и 22 день после трансплантации мышам опухолевых клеток.

Результаты представлены в виде медианы изменения экспрессии показателей в каждом органе в группах «Биоконтроль», «Опухоль+облучение» и «Опухоль», где «Биоконтроль» - контрольная группа мышей, не подвергающихся облучению, «Опухоль» - группа мышей, которым трансплантировали опухолевые клетки

(карцинома Льюиса) и группа «Опухоль+облучение» - мыши с привитой опухолью, которых затем облучали 4х-кратно облучали в дозе 75 мГр с интервалом в 4 дня. Медиана групп «Опухоль+облучение» и «Опухоль» рассчитывается по отношению к медиане группы «Биоконтроль», принятой за единицу.

Акцент был сделан на изменении экспрессии генов *P53* и *NFkB* после 2ого и 4ого облучений. В табл. 6 показано, что экспрессия генов менялась неодинаково. После фракционированного облучения в дозе 150 мГр (2 облучения) в опухолях, костном мозге и крови происходило подавление активности гена *P53*. В то же время в селезенке и тимусе система P53 стабильности генома активировалась. Это указывает на то, что в клетках разных органов мышей ответ на 2х-кратное облучение в МДР был неодинаковым. После фракционированного облучения в дозе 300 мГр (4 облучения), экспрессия гена *P53* активировалась, что сопровождалось уменьшением роста опухоли.

Что касается другой исследованной системы, можно отметить, что в ответ на облучение в дозе 150 мГр, наблюдается активация гена NFkB в опухоли (табл. 6).

Установлено, что под воздействием МДР в нормальных лимфоцитах активировалась система P53 поддержания стабильности генома и ингибировалась система NFkB. С другой стороны, в опухолевых клетках линии Jurkat не отмечалась активации P53 -системы, в то время как инициировалась система NFkB [185].

Из табл. 6 видна тенденция к подавлению p53 и активации NFkB систем после 2ого облучения в опухолевой ткани. В нормальной ткани (селезенке), отмечается противоположная корреляция (увеличение экспрессии *P53* и подавление *NFkB*). На 22 сутки после трансплантации опухолевых клеток, в опухолевой ткани, отмечается эффект активации защитной системы (p53), и подавление системы с противоположным ей эффектом (NFkB). Эти результаты положительно коррелируют с полученными нами ранее данными.

Таблица 6. Изменение экспрессии генов *P53* и *NFkB* в органах мышей после 2х и 4х облучений МДР

Орган	**Группа**	**2е облучение**		**4е облучение**	
		P53	***NFkB***	***P53***	***NFkB***
Опухоль	Опухоль	-	-	-	-
	Опухоль+облучение	↓	↑	↑	↑
Костный мозг	Опухоль	↓	↓	↑*	↑*
	Опухоль+облучение	↓	↓	↑*	↑
Кровь	Опухоль	↓	↑	↑	↑
	Опухоль+облучение	↓	↓	-	↑
Селезенка	Опухоль	↑	↑*	↑*	↓
	Опухоль+облучение	↑	↓	↑*	↓
Тимус	Опухоль	↑	↑	↓*	↑
	Опухоль+облучение	-	↓*	↑	↑
Печень	Опухоль	↓	↓	↑	↑
	Опухоль+облучение	↑*	↓	↓	↑

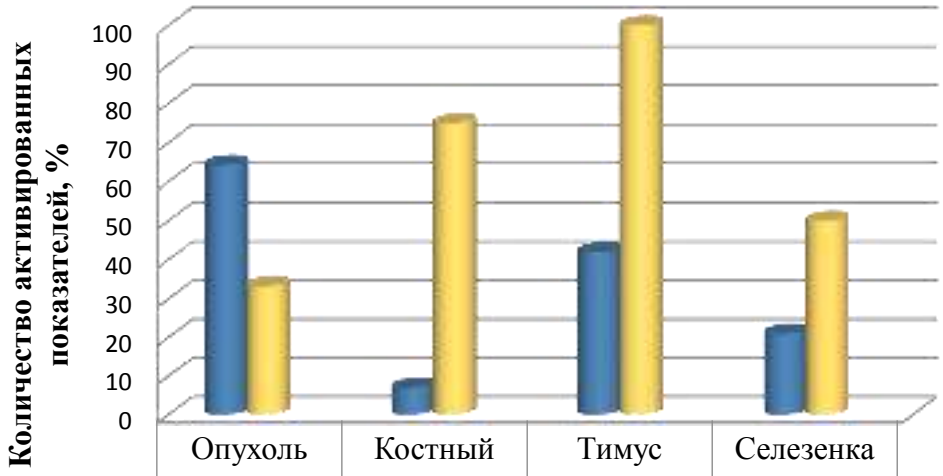
Примечание:
- нет изменений (медиана равна 1)
↑ - отмечается активация экспрессии
↓ - отмечается подавление экспрессии
** - статистически значимое изменение ($p<0,05$)*

В табл. 7 приведен анализ изменения активности онкогенов и онкосупрессоров в группе «Опухоль+облучение» по отношению к группе «Опухоль» выраженных в долях медианы (принятой за единицу) в опухолевой ткани, костном мозге и тимусе мышей после 4х облучений (на 22 сутки).

Показано, что в опухолевых клетках количество активированных онкосупрессоров составляло 33,3% (активируется 2 из 6 исследуемых онкосупрессоров), в то время как процент активированных онкогенов составляет 64,3% (9 из 14 показателей). В костном мозге отмечалась активность 75% супрессоров (повышенная экспрессия генов *P53*, *PTEN* и днРНК PINT и DINO). Кроме того в этой же группе активировался только онкоген (*TAL1*), что составляет 7% от числа исследуемых онкогенов. В тимусе была обнаружена инициация действия всех онкосупрессоров (100%) и лишь 6 онкогенов (42%). Для селезенки характерна активация 50% онкосупрессоров и 21% онкогенов (рис. 24).

Таблица 7. Оценка относительного изменения активности онкогенов и онкосупрессоров в группе «Опухоль+облучение» по отношению к группе «Опухоль» в опухолевой ткани, костном мозге, тимусе и селезенке мышей после 4х облучений

Показатели	**Орган**			
	Опухолевые клетки	Костный мозг	Тимус	Селезенка
Онкогены				
NFkB(p50)	1,58	0,87	0,52	0,79
NFkB(p65)	1,19	0,81	1,0	0,90
TNFa	1,15	0,93	0,78	1,0
G-CSF	1,24	0,89	0,72	1,19
Cyclin E2	0,71	0,84	**4,0***	1,3
IAP1	1,13	1,0	0,76	1,0
IAP2	1,32	0,98	1,43	0,79
IkBa	1,42	0,96	0,76	0,87
iNOS	**1,94***	0,73	0,33	0,95
TAL1	1,0	1,18	1,37	1,15
CTCF	**0,00024***	0,93	**59,0***	0,87
MALAT1	0,87	0,87	2,92	1,07
NEAT1	1,09	0,93	0,84	0,87
miR-21	0,93	0,9	**2,98***	0,69
Онкосупрессоры				
P53	1,68	1,23	1,61	0,9
PTEN	0,92	1,04	2,77	0,96
p38α	0,76	0,93	2,25	1,03
PINT	1,34	1,31	**3,11***	1,0
DINO	0,93	1,19	**2,97***	1,15
lncp21	0,84	0,96	3,03	1,19
* - Указывает на статистически значимые изменения ($p<0,05$) по критерию Манна-Уитни				



	Опухоль	Костный мозг	Тимус	Селезенка
Онкогены,%	64,3	7	42	21
Онкосупрессоры,%	33,3	75	100	50
Относительное изменение активированных онкосупрессоров к онкогенам	0,5	10,7	2,4	2,4

Рис. 24. Процент активированных онкогенов и онкосупрессоров в различных органах мышей в ответ на МДР

Таким образом, полученные данные о разнонаправленности экспрессии онкогенов и онкосупрессоров подтверждают наши предыдущие исследования, проведенные на нормальных лимфоцитах и Т-лимфобластных клеточных линиях, в которых показано формирование АО в нормальных клетках и его отсутствие в злокачественных [179, 185]. Из диаграммы на рис. 24 видно, что в нашей модели трансплантированной опухоли АО не формировался в опухолевых клетках, что коррелировало с соотношением активированных супрессоров к онкогенам (0,51), которое оказалось ниже, чем процентное соотношение активированных супрессоров к онкогенам в костном мозге и тимусе, составляющие 10,7 и 2,4, соответственно.

Особое внимание было уделено анализу экспрессии показателей в перевитых опухолях. Наиболее значимыми оказались изменения экспрессии онкогенов *CTCF* и днРНК MALAT1. Показано подавление активности гена *CTCF* и днРНК MALAT1 в 4166 и 1,15 раз, соответственно (рис. 25А).

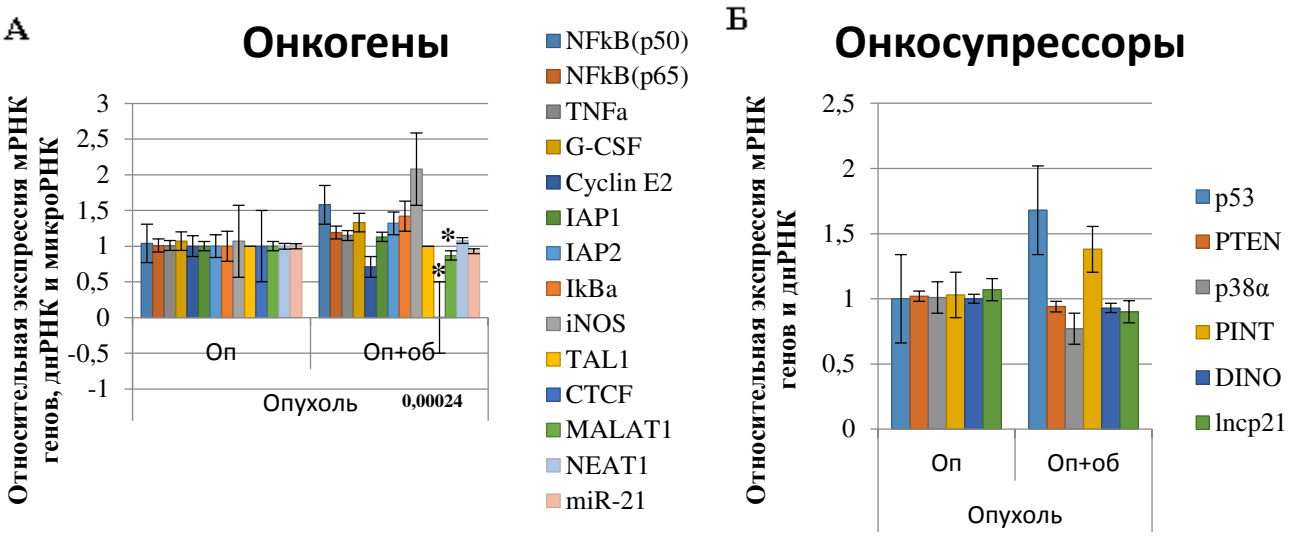


Рис. 25. Относительная активность онкогенов и онкосупрессоров в опухолевых тканях инокулированных мышей после 4х фракционированных облучений

** - Указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни*

Медиана группы «опухолей» принята за единицу

Однако в тимусе экспрессия днРНК MALAT1 четко отличалась от экспрессии в костном мозге (рис.26). Активность днРНК MALAT1 повышалась в 3,04 раза в группе «Опухоль+облучение», что говорит о выраженной тенденции этого процесса. В селезенке также отмечалось увеличение роста экспрессии днРНК MALAT1 (в 1,19 раз).

Нами показано, что изменения экспрессии гена *CTCF* в нормальных органах коррелируют с изменениями в опухолях. В частности, подавление активности этого гена зафиксировано в селезенке и тимусе – в 1,45 и 25 раз, соответственно (p<0,05), в отличие от костного мозга, где его активность выросла в 1,11 раз по сравнению с «Биоконтролем» (рис.26), что свидетельствует о прогрессировании этого процесса.

Известен ряд онкосупрессоров, среди которых наиболее изученными и важными являются гены *P53* и *PTEN*. Они выступают основными факторами в функционировании многих клеточных сигнальных путей и объединяются для содействия устранения аномальных клеток, образующихся в ответ на стрессовые воздействия, в частности на ИИ.

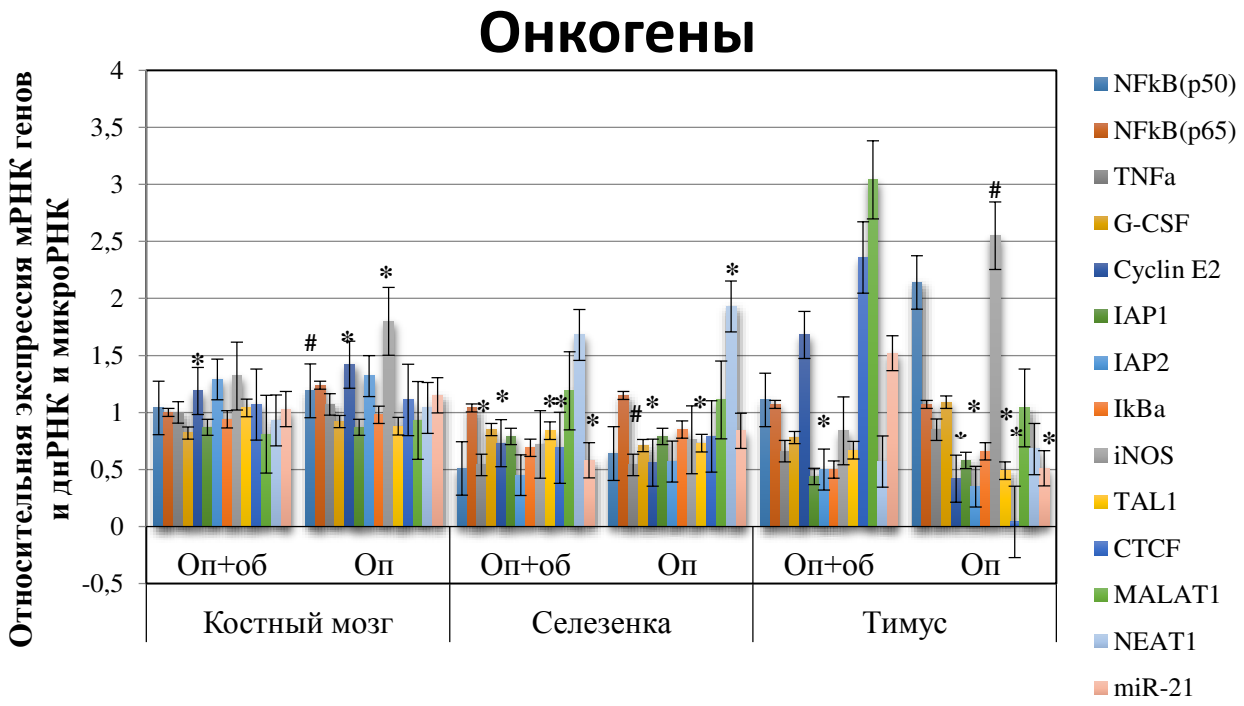


Рис. 26. Относительная активность онкогенов в костном мозге, селезенке и тимусе в группах «Опухоль+облучение» и «опухоль» инокулированных мышей после 4х фракционированных облучений

** - Указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни*

 # - Указывает на статистически значимые изменения (p<0,1) по критерию Манна-Уитни

Относительная экспрессия в группах «Опухоль+облучение» и «опухоль» соотносится к медиане группы «биоконтроль», принятой за единицу.

Ответом на клеточные стрессы и индуцированные повреждение ДНК является корреляция с повышением уровня экспрессии гена *P53*, что приводит к процессам остановки клеточного цикла, репликации и репарации ДНК или апоптозу. Таким образом, можно полагать, что *P53* имеет решающее значение в ингибировании деления злокачественных раковых клеток [186].

На рис. 27 продемонстрированы изменения экспрессии гена *P53* и днРНК PINT в различных органах. Аналогичные изменения с клетками опухоли отмечались и в костном мозге у гена *P53*, активность которого увеличивалась одинаково в группах «Опухоль+облучение» и «Опухоль» в 1,23 раза по сравнению с «Биоконтролем». Однако, для днРНК PINT, также являющейся онкосупрессором, не отмечалось соответствующих опухоли изменений.

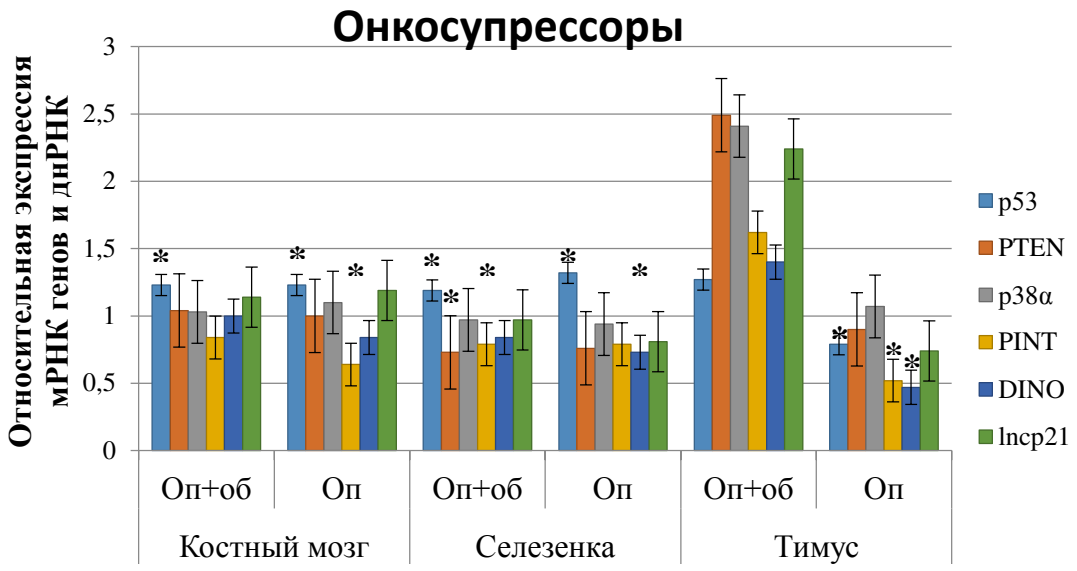


Рис.27. Относительная активность онкосупрессоров в костном мозге, селезенке и тимусе в группах «Опухоль+облучение» и «опухоль» инокулированных мышей после 4х фракционированных облучений

** - Указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни*

Относительная экспрессия в группах «Опухоль+облучение» и «опухоль» соотносится к медиане группы «биоконтроль», принятой за единицу

В частности, экспрессия днРНК PINT изменялась противоположным образом – и уменьшалась в 1,56 раз в клетках костного мозга. Аналогичное ингибирование активности этой днРНК наблюдалось и в других органах иммунной защиты – селезенке и тимусе: в 1,27 и 1,92 раза, соответственно. В ряде работ также показана роль днРНК PINT как супрессора опухолей [136, 187].

На рис. 26 и 27 отмечены выраженные изменения в экспрессии ряда показателей в клетках селезенки и тимуса. В частности, статистически значимо отличалась активность онкосупрессоров гена *PTEN* и днРНК DINO, а также для онкогенов *TAL1*, *Cyclin E2* и микроРНК miR-21 в группах «Опухоль+облучение» и «Опухоль» по сравнению с «Биоконтролем», хотя соответствующих изменений не наблюдалось в опухолевых тканях. Это может быть связано с ответом клеток на облучение и активацией разных патологических путей при воздействии МДР, а также стимуляцией репарационных процессов.

На рис. 25Б в опухолевых тканях нами отмечалась только тенденция к снижению активности гена *PTEN* (p<0,1), в то же время в селезенке (рис. 27) фиксируется

статистически значимое подавление экспрессии гена *PTEN* в 1,37 раз в группе «Опухоль+облучение» ($p<0,05$).

Интересно, что аналогичная динамика характерна для днРНК DINO: в то время как в опухоли (рис.25Б) практически не отмечалось снижения экспрессии этой днРНК (изменение в 1,078 раз), в селезенке и тимусе наблюдалось значительное ингибирование ее активности – 1,37 и 2,13 раз ($p<0,05$) (рис.27). По данным других авторов активность днРНК DINO в клетках при различных типах рака также подавляется [121].

Нами показано ингибирование активности гена *CCNDE2* в селезенке и тимусе, которая падает в 1,79 и 2,38 раз, соответственно, в группе «Опухоль» по отношению к группе «Биоконтроль», а также снижение активности этого гена в 4 раза в тимусе в группе «Опухоль» по сравнению с группой «Опухоль+облучение» (рис.26).

Нами продемонстрировано, что онкоген *TAL1*, экспрессия которого, как можно было предполагать, должна возрастать, показал себя абсолютно противоположным образом (рис.26). И в селезенке, и в тимусе в группах «Опухоль» его активность снижалась в 1,37 и 2,04 раз, соответственно, ($p<0,05$).

Нами отмечено увеличение активности гена *NFkB(p50)* в клетках костного мозга и тимуса в 1,19 ($p<0,05$) и 2,14 раз ($p>0,05$), что подтверждает гипотезу о взаимодействии генов *TAL1* и *NFkB*. Кроме того, показана значительная роль микроРНК miR-21, активность которой значительно подавлена в селезенке и тимусе в 1,37 (группа «Опухоль+облучение») и 2,13 раз (группа «Опухоль»), соответственно (рис.26).

Известно, что различные микроРНК могут регулировать NFkB патологический путь. Так, например, miR-21 и miR-26b усиливают экспрессию гена *NFkB* за счет подавления активности *PTEN* по механизму положительной обратной связи [94].

В работе по изучению воздействия miR-21 на потенциальные мишени, был обнаружен сайт связывания на гене *PTEN*, что свидетельствует о том, что последний является мишенью микроРНК miR-21 [139]. Клеточная пролиферация может активироваться за счет активации мишеней miR-21, что может способствовать клеточной пролиферации, инвазии, развитию метастазов и ингибированию процессов апоптоза [188].

Таким образом, действие МДР оказывало выраженное влияние на активность генов и некодирующих РНК в различных органах и тканях мышей, инокулированных опухолевыми клетками. Динамика опухолеобразования при действии МДР у мышей

была различной, при этом уменьшение размеров опухолей при МДР коррелировало с изменением соотношения онкогенов и онкосупрессоров. Оказалось, что в опухоли большинство исследованных онкогенов активировались чаще, чем представители онкосупрессоров, а именно 9 из 14 для первой группы и 2 из 6 - для второй, так что соотношение активируемых продуктов онкогенов и онкосупрессоров составило 0,51. Аналогичный подход к ответу на радиацию здоровых тканей облученного в МДР организма дал напротив преимущественную активизацию онкосупрессоров по отношению к онкогенам (10,7; 2,4 и 2,4, соответственно для костного мозга, тимуса и селезенки).

3.3.2. Оценка активности генов и некодирующих РНК в процессе опухолеобразования при пролонгированном облучении мышей

В данном эксперименте были исследованы в комплексе активность генов, днРНК и микроРНК на 8 и 10 месяц в костном мозге мышей после пролонгированного облучения (в отличие от других авторов, которые исследовали или микроРНК или днРНК в ответ на действие радиации) [189, 190]. При этом на 10 месяц была исследована активность этих соединений у облученных мышей без опухоли и с образовавшимися опухолями. Эти данные важны, с одной стороны, для понимания механизмов радиоиндуцированного канцерогенеза, а с другой, исследованные гены и некодирующие РНК могут быть использованы в качестве показателей риска развития опухоли, служить в качестве ранних биомаркеров этого процесса, а также возможных мишеней для терапии.

На рис. 28 и 29 представлено относительное содержание мРНК генов, днРНК и микроРНК (медиана и квартили) в группах «Биоконтроль», «Облучение», «Облучение+опухоль» в костном мозге мышей на 8 и 10 месяцы после облучения, а также проанализированы особенности экспрессии онкогенов и онкосупрессоров.

Из данных на рис. 28 видно, что через 8 месяцев после облучения отмечалось статистически значимое повышение экспрессии онкогенов *NFkB(p50), NFkB(p65)* и их генов-мишеней: *G-SCF* и *iNOS*, в группе «Облучение» в 1,27, 1,23, 1,19 и 1,32 раза, соответственно, в то время как изменение активности остальных исследуемых генов и некодирующих РНК выявлено не было.

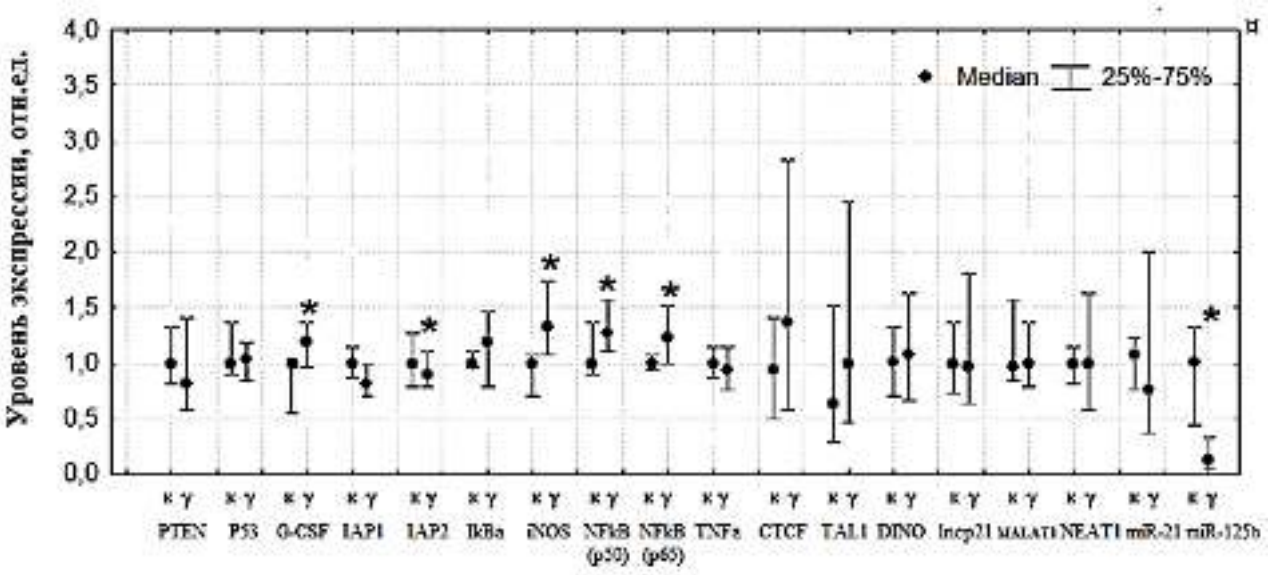


Рис. 28. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квартили) в костном мозге мышей через 8 месяцев после облучения

к - необлученная группа («Биоконтроль»)
γ - группа облученных мышей («Облучение»)
** - указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни между группами «Облучение» и «Биоконтроль».*
Медиана группы «Биоконтроль» принята за единицу

Через 10 месяцев после облучения у 14 из 94 мышей гистологически были выявлены лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно. При этом значительно изменялась экспрессия различных генов и их регуляторов. В частности, отмечалось снижение функциональной активности генов *NFkB(p65)* и *iNOS.* в 1,15 и 1,17 раз в группах «Облучение» и «Облучение + опухоль», соответственно, а для гена *iNOS* – в 1,62 раза в группе «Облучение + опухоль», по отношению к группе «Биоконтроль» (рис.29). Полученные результаты свидетельствуют о том, что в нормальных клетках костного мозга мышей независимо от образования опухоли значимо снижалась активность гена *NFkB.*

Из рис. 29 видно, что экспрессия генов *PTEN, iNOS, CTCF, TAL1* и днРНК lncp21, NEAT1, и микроРНК miR-125b снижена в группе «Облучение + опухоль» и подавлялась активность генов *IκBα, TAL1* и микроРНК miR-125b в группе «Облучение» (рис.29).

Аналогичные данные были получены и в других опухолях. Так, снижение экспрессии днРНК NEAT1 было показано при раке желудка [191], однако, было отмечено увеличение ее активности при раке гортани [192], что ассоциировалось с

неблагоприятным прогнозом и метастазированием опухолей. Это говорит о специфичности ответа на действие радиации.

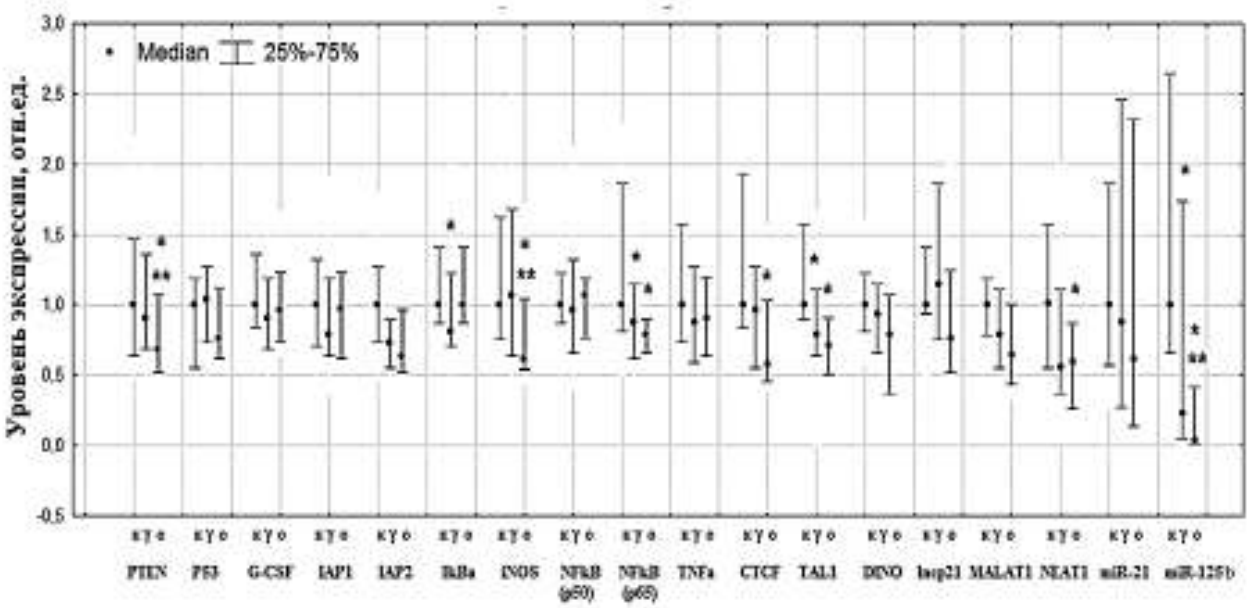


Рис. 29. Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК (медиана и квартили) в костном мозге мышей через 10 месяцев после облучения

к - необлученная группа («Биоконтроль»)
γ – группа облученных мышей («Облучение»)
о - группа облученных мышей с опухолями («Облучение+опухоль»)
** - указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни между группами «Облучение» и «Биоконтроль» или «Облучение+опухоль» и «Биоконтроль».*
***- указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни между группами «Облучение+опухоль» и «Облучение».*
Медиана группы «Биоконтроль» принята за единицу

В клетках костного мозга мышей после пролонгированного облучения отмечалось подавление активности микроРНК. Так, экспрессия miR-125b снижалась в 8,3 и в 4,3 раза на 8 и 10 месяц, соответственно, в группе «Облучение» и в 33 раза в группе «Облучение + опухоль» на 10 месяц. В литературе показано, что miR-125b проявляет свойства онкосупрессора при немелкоклеточном раке легкого и раке молочной железы[193]. Наши данные свидетельствуют о вовлеченности miR-125b в процесс опухолеобразования, медиана которой к 8 месяцу составляла 0,13 отн.ед. в группе «Облучение», а к 10 месяцу – 0,23 и 0,036 отн.ед. в группе «Облучение» и «Опухоль», соответственно.

На примере активности гена *NFkB* на 8 и 10 месяц после облучения можно рассмотреть механизм его изменений и возможность использования как раннего

показателя опухолеобразования. При анализе активности гена *NFkB* в костном мозге мышей нами показано увеличение его экспрессии на 8 месяц после облучения.

Из литературы известно, что активация NFkB-системы в клетках различных типов рака может быть связана с устойчивостью опухолей к радио- и химиотерапии [194], а блокирование активности NFkB в различных клеточных линиях включает процессы апоптоза и снижает рост опухоли [195].

Подавление NFkB -активности может быть достигнуто за счет сверхэкспрессии его главного регулятора – IkBα, что увеличивает радиочувствительность опухолей при терапии. Однако через 10 месяцев после облучения было выявлено снижение активности гена *NFkB.* Аналогичные результаты изменения экспрессии гена *NFkB* были получены при воздействии повреждающей острой дозы (5 Гр) на нормальные лимфоциты человека и клетки линии Jurkat [1]. Ингибирование активности гена *NFkB* также наблюдалась и после радиотерапии рака слизистой оболочки рта, что, скорее всего, было связано со снижением активности процессов деления, поскольку NFkB является ТФ для гена *CCND1*, вовлеченного в процессы клеточного цикла [196]. Следовательно, ген *NFkB* может рассматриваться как ранний показатель радиоиндуцированного опухолеобразования.

Кроме того, к 10 месяцу после облучения было показано снижение содержания мРНК гена *PTEN*. Функциональная инактивация *PTEN* может происходить в раковых клетках посредством точечной мутации, делеции гена или эпигенетических механизмов.

Мутации гена также могут влиять на рецепторы тирозинкиназы, факторы роста, Ras и субъединицу PI3K p110, что приводит к аномальной сигнальной активности, характерной для опухолевых клеток. Следовательно, многие из генов и белков этого метаболического пути могут быть мишенями при лечении рака. Помимо этого, *PTEN* взаимодействует с *P53* через различные механизмы. Первый из них заключается в ингибировании геном *PTEN* активности *MDM2*, который в нормальных клетках нацелен на деградацию *P53*. Благодаря внешним воздействиям (например, ИИ) происходит подавление активности *MDM2*, разрушение его связи с *P53*, следствием чего является активация последнего. Второй путь активируется за счет индукции повреждений ДНК, что приводит к увеличенному синтезу белка p53 и активации транскрипции *PTEN*, который по механизму положительной обратной связи предотвращает деградацию p53[109]. Ген *PTEN* выступает в качестве раннего биомаркера формирования опухолей.

В работах по изучению некодирующих РНК показано, что они играют важную роль в инициации и развитии опухолей, а дисрегуляция их экспрессии обнаружена при различных типах рака. Наиболее значимые значения были описаны для днРНК lncp21, NEAT1 и miR-125b [197-199].

В проведенном эксперименте было показано повышение экспрессии lncp21 в костном мозге мышей на 10 месяц после облучения в группе «Облучение» и достижение снижения содержания этой днРНК в группе «Облучение + опухоль» ($p<0,05$).

Известно, что lncp21 является прямой мишенью гена *P53*, а экспрессия этой днРНК понижается при раке желудка. Кроме того, продемонстрирована сверхэкспрессия lncp21 после ИИ, что подавляло пролиферацию опухолевых клеток желудка и увеличивало радиочувствительность злокачественных клеток. Таким образом, lncp21 проявляла свойства онкосупрессора [197].

Как видно из рис.29, экспрессия днРНК NEAT1 в группе «Облучение + опухоль» снижалась по сравнению с контрольной группой. В литературе показана его роль и как онкогена [193, 198], и как онкосупрессора [200].

В отношении микроРНК miR-125b отмечено снижение ее экспрессии как на 8 месяц после облучения (в 8,3 раза) в группе «Облучение», так и на 10 месяц (в 4,3 и 25 раз) в обеих исследуемых группах «Облучение» и «Облучение+опухоль». Аналогичные данные были получены при исследовании экспрессии miR-125b в клетках рака шейки матки [201]. MiR-125b является триггером активации NFkB - патологического пути, который запускает процессы клеточной пролиферации, миграции и инвазии за счет воздействия на PI3K/Akt/mTOR патологический путь [199]. Можно полагать, что miR-125b также может служить как показатель ответа на действие радиации.

Оценка активности генов и некодирующих РНК при радиации, обсуждается при разных патологиях человека в качестве показателей ответа на действие радиации. По этой причине, предлагается использовать разные генные структуры в качестве ранних биомаркеров развития патологии, в том числе опухолеобразования, а также ответа на терапию. Некоторые авторы предлагают в качестве чувствительных к радиации мишеней микроРНК [6]. МикроРНК репрезентативны при облучении. Так, при исследовании 576 микроРНК в клетках печени 21 из них могли быть предикторами облучения, что было доказано при использовании 9 разных методов оценки их активности. Преимуществом этих структур является возможность их активности в

разных биологических материалах (плазма, слюна, слезы, даже при экстракции из парафинированных материалов). МикроРНК достаточно стабильны в организме по сравнению с другими молекулами [202].

Другими авторами сделан акцент на днРНК, являющихся регуляторами генов, поскольку их роль особенно высока в иммунном ответе на радиационное воздействие, что считается главным вкладом в положительные эффекты радиации при разных патологических процессах [190]. В нашем эксперименте исследовался комплекс генов и некодирующих РНК, уровни которых изменялись в ответ на действие радиации. При анализе изменения активности генов, микроРНК и днРНК как возможных ранних предикторов радиоиндуцированных опухолей: исследованные показатели были разделены на структуры, обладающие, по существующим представлениям, онкогенными или супрессорными функциями.

На рис.30 представлены только статистически значимые данные по активности генов, микроРНК и днРНК на 10 месяц после облучения мышей с опухолями и без них среди группы всех исследованных генетических структур.

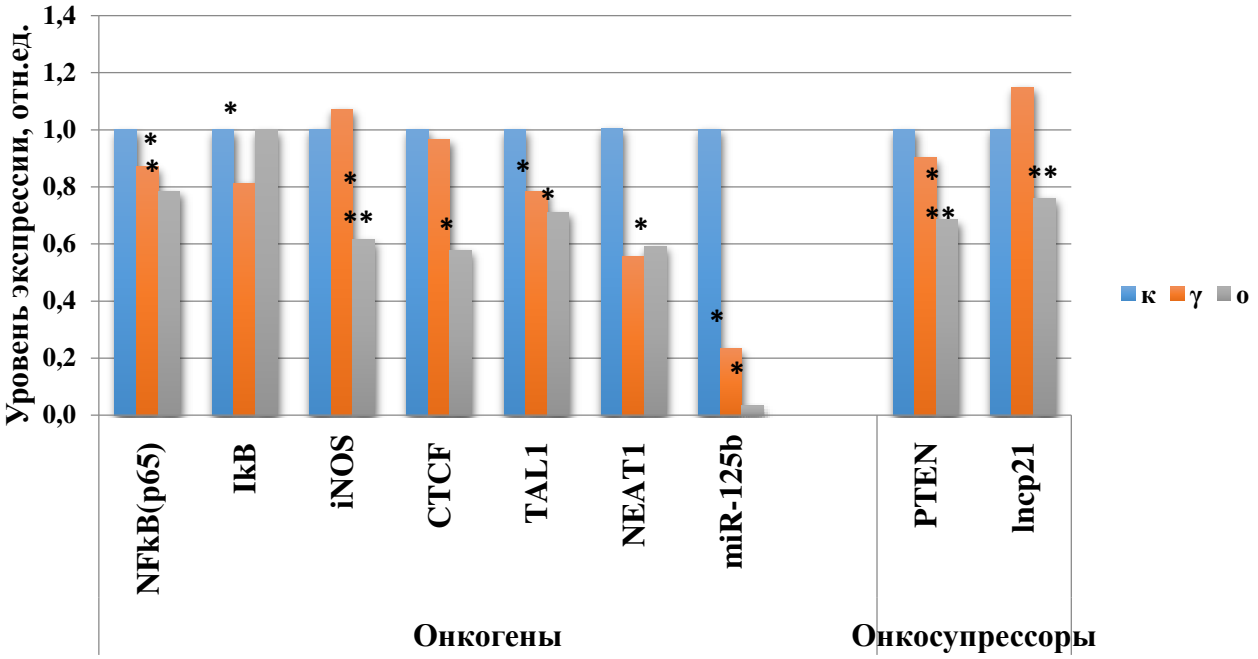


Рис.30. Содержание мРНК онкогенов и онкосупрессоров (медиана) со значимыми различиями между изученными группами в костном мозге мышей через 10 месяцев после облучения

к - необлученная группа («Биоконтроль»)
γ – группа облученных мышей («Облучение»)
о- группа облученных мышей с опухолями («Облучение+опухоль»)
** - указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни между группами «Облучение» и «Биоконтроль» или «Облученные с опухолями» и «Биоконтроль».*
***- указывает на статистически значимые изменения (p<0,05) по критерию Манна-Уитни между группами «Облученные с опухолями» и «Облучение».*
Медиана группы «Биоконтроль» принята за единицу

Суммируя данные по результатам изменения активности исследуемых показателей можно прийти к выводу о комплексном участии ряда генов, микроРНК и днРНК в радиоиндуцированном опухолеобразовании (рис. 31). За счет активации гена *NFkB* под воздействием ИИ активировались также его гены - мишени (*TNFα, G-SCF, IAP-1, IAP-2, IκBα, iNOS, CTCF*), параллельно с этим происходило подавление активности гена *P53* и его мишеней – гена *PTEN* и днРНК lncp21. В случае miR-125b отмечался разнонаправленный эффект. Так, на 8 месяц после облучения активность гена *NFkB* возрастала, при сниженной активности miR-125b, проявляющей свойства, как онкогена, так и онкосупрессора, однако к 10 месяцу экспрессия гена *NFkB* снижалась, в то время, как активность miR-125b оставалась пониженной. Такие изменения могут быть связаны

не только с ответом клетки на воздействие ИИ, но и с проникновением в костный мозг «онкосом», выделяемых опухолью.

Информация о механизмах действия радиации на генетические структуры может быть использована для создания панели биомаркеров конкретных опухолей. Полученные показатели об изменении генных структур в дальнейшем могут служить мишенью для специфической терапии.

К 8 месяцу после облучения 46% онкогенов (6 из 13) проявили свою активность в ответ на действие ИИ (*G-SCF, IkBa, iNOS, NFkB(p50), NFkB(p65)* и *CTCF*), и лишь 31% - подавлялись. Для 60% онкосупрессоров (3 из 5) было характерно ингибирование их экспрессии (*PTEN*, lncp21, miR-125b). К 10 месяцу после облучения в группе «Опухоль» подавлялось 86% онкогенов и 100% онкосупрессоров. Таким образом, к 8 месяцу после облучения преобладало число активированных онкогенов, что связано с выходом опухолей к 10 месяцу.

Анализ представленных результатов позволяет сделать предварительный вывод о том, что оценка активности генов и некодирующих РНК (*NFkB(p65), CTCF, iNOS, TAL1,* днРНК lncp21, NEAT1 и miR-125b) может быть применена для раннего прогноза радиоиндуцированного опухолеобразования и служить биомаркерами это процесса.

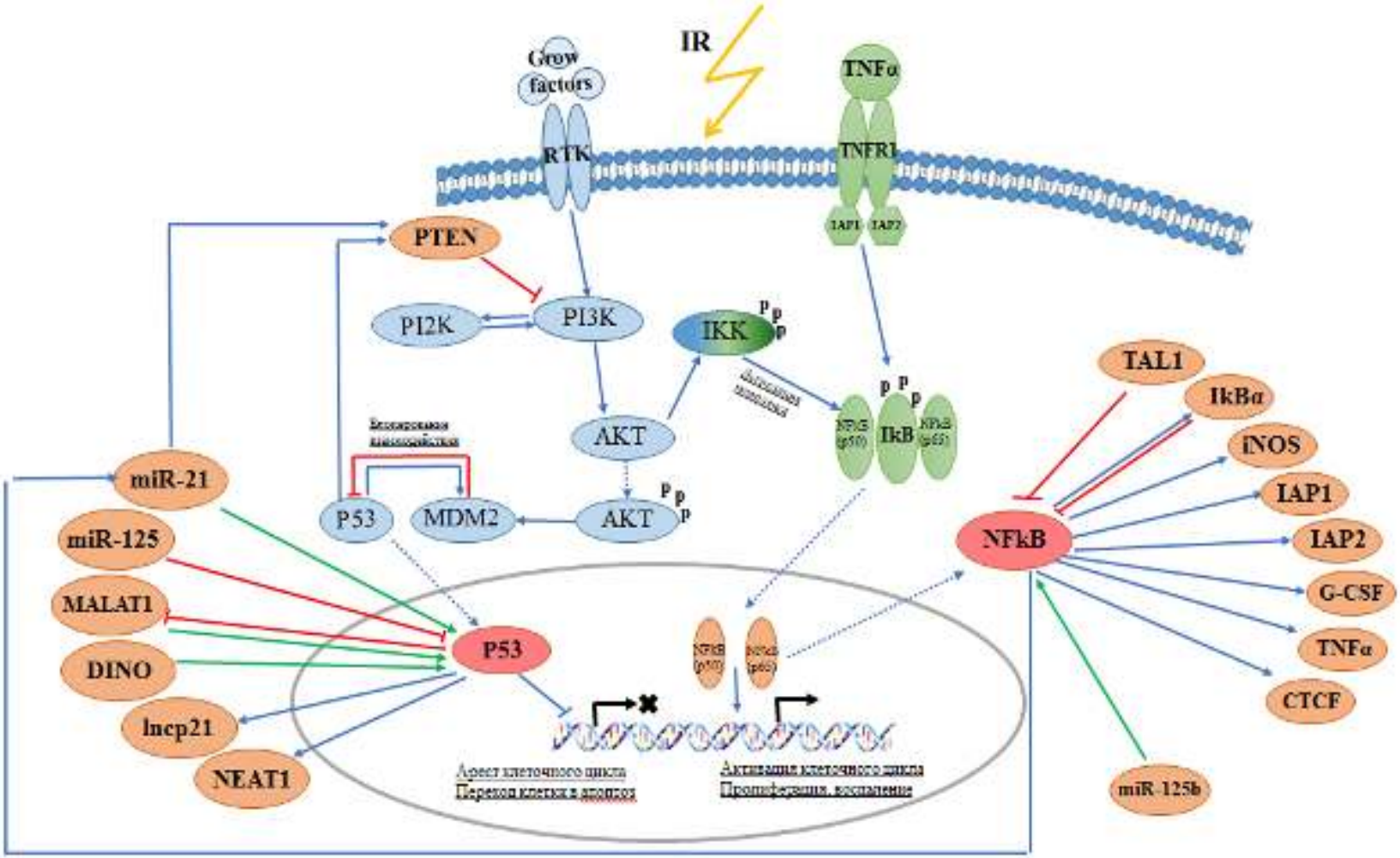


Рис. 31. Патологические пути P53 и NFkB при действии радиации в опухолевых клетках

Голубые овалы – PI3K-путь, зеленые – NFkB-путь. Розовые – активированные гены P53 и NFkB. Оранжевые овалы - мишени/активаторы генов P53 и NFkB. p- фосфорилированный продукт

Зеленые стрелки - пути активации P53 и NFkB, Синие стрелки – мишени генов P53 и NFkB

Красные линии – блокирование транскрипции и экспрессии гена, Прерывистые линии – активация гена с транслокацией в/из ядра

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгое время гипотеза о влиянии радиации на живые организмы рассматривалась в парадигме беспорогового поражения, при котором даже МДР (<0,1 Гр) могут оказывать неблагоприятное действие на здоровье человека [203].

Однако за последние годы исследование эффекта МДР вышло за рамки этой концепции, поскольку появлялось большее число доказательств в пользу существования определенного порога, облучение ниже которого стимулировало защитные механизмы организма от последующего облучения в ВДР, являющейся причиной радиоиндуцированных онкологических заболеваний. Было показано, что эффекты влияния МДР на клетки сопровождалось положительным действием на некоторые показатели здоровья и продолжительность жизни [38].

Это было обнаружено при анализе показателей здоровья в регионах с естественно повышенным фоном радиации, когда было отмечено уменьшение числа онкозаболеваний и ряда других патологий и увеличение продолжительности жизни (штат Керала в Индии, некоторые провинции в Китае, Бразилии и пр.) [204].

В настоящее время действие МДР применяют для терапии ряда заболеваний: патологии воспалительного характера, аутоиммунные заболевания, синдром Альцгеймера и др [4, 205, 206]. Стимулирующее действие МДР на иммунную систему организма имеет и практическое значение при радиокатастрофах. В этом случае переселения людей из регионов должно учитывать отсутствие вредного влияния МДР.

После воздействия ИИ на клетки активируются сложные процессы молекулярного ответа, которые сопровождаются изменениями в экспрессии генов и их регуляторов. В связи с этим изучение действия МДР и ВДР на активность генов и некодирующих РНК представляет особый интерес в аспекте различий их биологического эффекта. Эти данные позволяют определить молекулярные механизмы действия радиации как при действии МДР, так и в процессе развития радиоиндуцированных опухолей.

Исследования воздействия ИИ в разных дозах на профиль экспрессии генов и некодирующих РНК показали, что дозы ниже 10 мГр могут являться триггером для активации экспрессии генов в клетках. Это связано с запуском каскада реакций, вследствие влияния ИИ иммунный статус, за счет стабилизации ДНК, изменения

баланса генов, активирующий защитные механизмы, поскольку сопровождаются остановкой клеточного цикла или апоптозом [65].

Следует отметить, что в отличие от работ, где изучали отдельные функциональные единицы ответа на ИИ (или микроРНК, или днРНК), нами был изучен комплекс молекулярно-генетических показателей, состоящих из взаимодействия ряда генов и некодирующих РНК.

В экспериментах на лимфоцитах человека и опухолевой линии лимфобластных клеток Jurkat показана активация P53 – системы через 1 час после действия МДР, что отражалось в повышении уровня экспрессии мРНК гена *P53* и снижении активности miR-27a и miR-181a, для которых ген *P53* является мишенью. Кроме того, отмечалось также повышение активности днРНК Gas5, выполняющего функцию поддержания активности *P53*. Кроме того выявлено снижение активности системы NFkB через 1 час после действия МДР, которая проявлялась снижением мРНК генов мишеней *NFkB*, а именно мРНК генов *RhoA*, *cdc42* и *IL6* и увеличением содержания днРНК Gas5. В клетках линии Jurkat, действие МДР не было отмечено по ряду показателей, в том числе не возникало активации системы P53. Следовательно, в нормальных клетках в отличие от злокачественных наблюдали формирование АО.

Оптимизация лучевой терапии может быть связана с применением МДР, поскольку в злокачественных клетках не формируется АО. Основываясь на ряде исследований, предполагается использование действие МДР для стабилизации нормальных, окружающих опухоль тканей при лечении онкобольных с последующим применением больших доз, применяемых при радиотерапии [38, 181, 185].

Полученные нами данные позволяют рассмотреть возможные ранние биомаркеры радиоиндуцированного опухолеобразования у мышей линии (CBA x C57Bl) F1 по критерию активности генов-супрессоров и онкогенов уже на 8 месяц еще до образования опухолей. Отмечено статистически значимое повышение активности 46% онкогенов и подавление 60% исследуемых онкосупрессоров в костном мозге мышей после пролонгированного облучения в дозе 12,6 Гр. Анализ представленных результатов позволяет сделать вывод о том, что оценка активности генов (*NFkB(p65), iNOS, CTCF, TAL1,* днРНК lncp21, NEAT1 и miR-125b) может быть использована для раннего прогноза радиоиндуцированного опухолеобразования, а сами гены и их регуляторы могут служить биомаркерами этого процесса.

У мышей линии C57Bl/6 с трансплантированными клетками карциномы Льюиса, которых 4х-кратно облучали в малой дозе, число активированных онкосупрессоров превышало число онкогенов в тканях, непринимающих непосредственного участия в опухолевом процессе (например, 7% онкогенов и 75% супрессоров в костном мозге) на 22 сутки после инокуляции. Показатели *P53*, *PTEN*, *CTCF,* днРНК PINT, DINO и miR-21 могут расцениваться как маркеры формирования защитных механизмов в нормальных тканях.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что гены и их регуляторы - днРНК и микроРНК, вовлечены в процессы радиоиндуцированного опухолеобразования. Такие показатели, как онкосупрессоры гены *P53*, *PTEN,* днРНК PINT, DINO, зрелые miR-27a и miR-125b могут служить как ранние биомаркеры развития этого процесса уже на ранних сроках после облучения. Изменения активности этих функциональных единиц можно обнаружить, исследуя периферическую кровь или костный мозг. Анализ литературных данных подтверждает важность изучения *CTCF, TAL1,* днРНК lncp21, NEAT1, MALAT1 в целях диагностики и прогноза онкозаболеваний, а также возможности повышения устойчивости тканей, окружающих опухоль, облученных в малой дозе перед облучением в высокой дозе, применяемые при радиотерапии.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены статистически значимые различия в чувствительности нормальных и злокачественных клеток человека *in vitro* к радиации, при предварительном облучении в малой дозе (0,1 Гр) с последующим воздействием в высокой дозе (5 Гр), что отражалось в повышении выживаемости лимфоцитов здоровых доноров, предварительно облученных в малой дозе, и изменении активации генов (*NFkB, P53*), днРНК (ROR, MALAT1, NEAT1) и микроРНК (miR-27a, miR-107, miR- 181a).

2. Комплексное изучение ответа на действие радиации нормальных и злокачественных клеток человека позволило определить изменение активности ряда генов и некодирующих РНК в нормальных клетках по сравнению с этими же структурами в злокачественных клетках, в которых они были неактивны (*PTEN,* miR-21, miR-27a).

3. Пролонгированное облучение мышей линии (CBA×C57Bl) F1 показало, что к 10 месяцу после воздействия ИИ у 14 из 94 исследованных животных обнаружены радиоиндуцированные злокачественные лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно. Анализ генов и некодирующих РНК в клетках костного мозга этих мышей на 8 и 10 месяц после начала облучения определил различия в вовлеченности конкретных генов и некодирующих РНК в ответ на действие радиации, когда наблюдались статистически значимые изменения в активности генов, обладающих супрессорными (*PTEN*, lncp21) или онкогенными свойствами (*NFkB(p65), IkBα, iNOS, CTCF, TAL1,* NEAT1, miR-125b).

4. Активность генов, днРНК и микроРНК после пролонгированного облучения в клетках мышей без опухолеобразования по сравнению с этими же структурами у мышей с опухолями, могут рассматриваться как потенциальные показатели, которые можно оценивать, как ранние биомаркеры опухолеобразования.

5. Фракционированное облучение мышей (4х-кратно в дозе 75 мГр) с трансплантированными опухолями выявило снижение роста и объема опухоли по сравнению с контрольной группой без облучения, которое коррелировало с

повышенной активностью исследуемых онкосупрессоров и сниженной активностью онкогенов у облученных мышей.

6. Данная работа дает возможность исследования значений экспрессии онкогенов и генов - супрессоров не только при действии радиации, но и при других возможных стрессовых воздействиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО - адаптивный ответ

АФК – активные формы кислорода

ВДР – высокие дозы радиации

ГР – гомологичная рекомбинация

ДНР – двунитевые разрывы ДНК

днРНК – длинные некодирующие РНК

ИИ - ионизирующее излучение

кДНК - комплементарная ДНК

КТ - компьютерная томография

ЛТ - лучевая терапия

МДР – малые дозы радиации

мРНК – матричная РНК

НР – негомологичная рекомбинация

ОНР – однонитевые разрывы ДНК

ОТ - обратная транскрипция

ПРГ - плоскоклеточный рак гортани

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ЭС - эффект свидетеля

ТФ - транскрипционный фактор

iNOS - индуцибельная синтаза оксид азота

СПИСОК ТЕРМИНОВ

Адаптивный ответ представляет собой универсальную реакцию клеток на облучение в малых дозах, выражающуюся в приобретении устойчивости к поражающему действию излучения в большой дозе или других агентов нерадиационной природы.

Гормезис: неспецифический эффект малых доз радиации, вызывающий диаметрально противоположные (стимулирующие) изменения по сравнению с повреждающими эффектами больших доз радиации на живые организмы.

днРНК: некодирующие РНК, которые как правило имеют длину более 200 нуклеотидов

МикроРНК: малые некодирующие молекулы РНК длиной 18—25 нуклеотидов

Онкогены: группа генов, мутации в которых отвечают за развитие процесса опухолеобразования (онкогенеза). Их действие реализуется посредством кодируемых ими онкобелков.

Онкосупрессоры: группа генов, тормозящие процессы развития опухолей

ПЦР-РВ: полимеразная лабораторный метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, позволяющий определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество её копий.

Эффект свидетеля: это феномен, заключающийся в проявлении «лучевых» повреждений в необлученных клетках, находящихся вблизи от облученных клеток в момент воздействия ионизирующей радиации, т. е. необлученные в данной ситуации клетки являются «свидетелями» нанесения лучевых повреждений другим клеткам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aryankalayil, M. J., Chopra, S., Levin, J. *et al*. Radiation-Induced Long Noncoding RNAs in a Mouse Model after Whole-Body Irradiation // Radiat Res. 189 (3): 251-263. (2018). 10.1667/RR14891.1
2. Bae, S., Kim, K., Cha, H. J. *et al*. Low-dose gamma-irradiation induces dual radio-adaptive responses depending on the post-irradiation time by altering microRNA expression profiles in normal human dermal fibroblasts // Int J Mol Med. 35 (1): 227-237. (2015). 10.3892/ijmm.2014.1994
3. Premkumar, K., Nair, J., Shankar, B. S. Differential radio-adaptive responses in BALB/c and C57BL/6 mice: pivotal role of calcium and nitric oxide signalling // Int J Radiat Biol. 95 (6): 655-666. (2019). 10.1080/09553002.2019.1571647
4. Bevelacqua, J. J., Mortazavi, S. M. J. Alzheimer 's Disease: Possible Mechanisms Behind Neurohormesis Induced by Exposure to Low Doses of Ionizing Radiation // J Biomed Phys Eng. 8 (2): 153-156. (2018).
5. Cuttler, J. M. Application of Low Doses of Ionizing Radiation in Medical Therapies // Dose Response. 18 (1): 1559325819895739. (2020). 10.1177/1559325819895739
6. Duale, N., Eide, D. M., Amberger, M. L. *et al*. Using prediction models to identify miRNA-based markers of low dose rate chronic stress // Sci Total Environ. 717 137068. (2020). 10.1016/j.scitotenv.2020.137068
7. Sokolov, M., Neumann, R. Global Gene Expression Alterations as a Crucial Constituent of Human Cell Response to Low Doses of Ionizing Radiation Exposure // Int J Mol Sci. 17 (1): (2015). 10.3390/ijms17010055
8. Grubbe, E. H. X-Ray Treatment: Its Origin, Birth and Early History // Journal of the American Medical Association. 142 (15): 1251-1251. (1950). 10.1001/jama.1950.02910330133039
9. Котеров, А. Н., Вайсон, А. А. Биологические и медицинские эффекты излучения снизкой ЛПЭ для различных диапозон доз // Радиационная биология. Радиоэкология. 60 (3): 5-31. (2015).
10. Falcke, S. E., Ruhle, P. F., Deloch, L. *et al*. Clinically Relevant Radiation Exposure Differentially Impacts Forms of Cell Death in Human Cells of the Innate and Adaptive Immune System // Int J Mol Sci. 19 (11): (2018). 10.3390/ijms19113574
11. Ali, Y. F., Cucinotta, F. A., Ning-Ang, L. *et al*. Cancer Risk of Low Dose Ionizing Radiation // Frontiers in Physics. 8 (234): (2020). 10.3389/fphy.2020.00234
12. Huang, L., Snyder, A. R., Morgan, W. F. Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis // Oncogene. 22 (37): 5848-5854. (2003). 10.1038/sj.onc.1206697
13. Cui, J., Yang, G., Pan, Z. *et al*. Hormetic Response to Low-Dose Radiation: Focus on the Immune System and Its Clinical Implications // Int J Mol Sci. 18 (2): (2017). 10.3390/ijms18020280
14. Cohen, B. L. Dose-response relationship for radiation carcinogenesis in the low-dose region // Int Arch Occup Environ Health. 66 (2): 71-75. (1994). 10.1007/BF00383360
15. Григоркина, Е. Б., Оленев, Г. В., Пашнина, И. А. Эффекты малых доз: адаптивный ответ у грызунов вагильных видов из зоны локального радиоактивного загрязнения // Междуна-родный журнал экспериментального образования. (11): 81-85. (2013).

16. Wall, B. F., Kendall, G. M., Edwards, A. A. *et al*. What are the risks from medical X-rays and other low dose radiation? // Br J Radiol. 79 (940): 285-294. (2006). 10.1259/bjr/55733882
17. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K. *et al*. A new paradigm in radioadaptive response developing from microbeam research // J Radiat Res. 50 Suppl A A67-79. (2009). 10.1269/jrr.09003s
18. Shin, S. C., Lee, K. M., Kang, Y. M. *et al*. Differential expression of immune-associated cancer regulatory genes in low- versus high-dose-rate irradiated AKR/J mice // Genomics. 97 (6): 358-363. (2011). 10.1016/j.ygeno.2011.01.005
19. Zhou, L., Zhang, X., Li, H. *et al*. Validating the pivotal role of the immune system in low-dose radiation-induced tumor inhibition in Lewis lung cancer-bearing mice // Cancer Med. 7 (4): 1338-1348. (2018). 10.1002/cam4.1344
20. Mladenov, E., Magin, S., Soni, A. *et al*. DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation // Semin Cancer Biol. 37-38 51-64. (2016). 10.1016/j.semcancer.2016.03.003
21. Кузин, А. М. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии: учебное пособие / Москва. Наука. 1970. 222.
22. Tounekti, O., Kenani, A., Foray, N. *et al*. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway // Br J Cancer. 84 (9): 1272-1279. (2001). 10.1054/bjoc.2001.1786
23. Valerie, K., Povirk, L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair // Oncogene. 22 (37): 5792-5812. (2003). 10.1038/sj.onc.1206679
24. Pellegrino, B., Musolino, A., Llop-Guevara, A. *et al*. Homologous Recombination Repair Deficiency and the Immune Response in Breast Cancer: A Literature Review // Transl Oncol. 13 (2): 410-422. (2020). 10.1016/j.tranon.2019.10.010
25. D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy // Cell Biol Int. 43 (6): 582-592. (2019). 10.1002/cbin.11137
26. Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M. *et al*. Regulation of Tumor Progression by Programmed Necrosis // Oxid Med Cell Longev. 2018 3537471. (2018). 10.1155/2018/3537471
27. Hou, L., Liu, K., Li, Y. *et al*. Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis // J Cell Sci. 129 (16): 3084-3090. (2016). 10.1242/jcs.184374
28. Proteintech Group. 2002-2019. https://www.ptglab.com/news/blog/what-is-the-difference-between-necrosis-and-apoptosis/ дата обращения: 17.02.2021.
29. Shimura, N., Kojima, S. The Lowest Radiation Dose Having Molecular Changes in the Living Body // Dose Response. 16 (2): 1559325818777326. (2018). 10.1177/1559325818777326
30. Rothkamm, K., Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses // Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (9): 5057-5062. (2003). 10.1073/pnas.0830918100
31. Кузин, А. М., Каушанский, Д. А. Прикладная радиобиология: (Теорет. и техн. основы) / Москва. Энергоатомиздат. 1981.
32. Smith-Bindman, R., Wang, Y., Chu, P. *et al*. International variation in radiation dose for computed tomography examinations: prospective cohort study // BMJ. 364 k4931. (2019). 10.1136/bmj.k4931

33. Борщеговская, П. Ю., Розанов, В. В., Студеникин, Ф. Р. Взаимодействие ионизирующего излучения с веществом: Учеб. пособие / Москва. ООП физического факультета МГУ. 2019. 78.
34. Sharda, N., Yang, C.-R., Kinsella, T. *et al* Radiation Resistance. Encyclopedia of Cancer. 2nd Edition / New Brunswick, U.S.A.: Academic Press; 2002. 1-11.
35. Гладилина, И. А. Радиосенсибилизация в лучевой терапии злокачественных новообразований // Эффективная фармакотерапия. 22 46-53. (2011).
36. Pawlik, T. M., Keyomarsi, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy // Int J Radiat Oncol Biol Phys. 59 (4): 928-942. (2004). 10.1016/j.ijrobp.2004.03.005
37. Богданов, И. М., Сорокина, М. А., Маслюк, А. И. Проблема оценки эффектов воздействия «малых» доз ионизирующего излучения // Бюллетень сибирской медицины. (2): 145-151. (2005).
38. Yang, G., Li, W., Jiang, H. *et al*. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics // Int J Cancer. 139 (10): 2157-2168. (2016a). 10.1002/ijc.30235
39. Jiang, H., Xu, Y., Li, W. *et al*. Low-dose radiation does not induce proliferation in tumor cells in vitro and in vivo // Radiat Res. 170 (4): 477-487. (2008). 10.1667/rr1132.1
40. Gandhi, N. M. Cellular adaptive response and regulation of HIF after low dose gamma-radiation exposure // Int J Radiat Biol. 94 (9): 809-814. (2018). 10.1080/09553002.2018.1493241
41. Kawamura, K., Qi, F., Kobayashi, J. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production // J Radiat Res. 59 (suppl_2): ii91-ii97. (2018). 10.1093/jrr/rrx091
42. Shelke, S., Das, B. Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation // Mutagenesis. 30 (3): 365-379. (2015). 10.1093/mutage/geu081
43. Mezentsev, A., Amundson, S. A. Global gene expression responses to low- or high-dose radiation in a human three-dimensional tissue model // Radiat Res. 175 (6): 677-688. (2011). 10.1667/RR2483.1
44. Yunis, R., Albrecht, H., Kalanetra, K. M. *et al*. Genomic characterization of a three-dimensional skin model following exposure to ionizing radiation // J Radiat Res. 53 (6): 860-875. (2012). 10.1093/jrr/rrs063
45. Rich, T., Allen, R. L., Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage // Nature. 407 (6805): 777-783. (2000). 10.1038/35037717
46. El-Saghire, H., Thierens, H., Monsieurs, P. *et al*. Gene set enrichment analysis highlights different gene expression profiles in whole blood samples X-irradiated with low and high doses // Int J Radiat Biol. 89 (8): 628-638. (2013). 10.3109/09553002.2013.782448
47. Fei, P., El-Deiry, W. S. P53 and radiation responses // Oncogene. 22 (37): 5774-5783. (2003). 10.1038/sj.onc.1206677
48. Wyrobek, A. J., Manohar, C. F., Krishnan, V. V. *et al*. Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation // Mutat Res. 722 (2): 119-130. (2011). 10.1016/j.mrgentox.2011.03.002

49. Ding, X., Cheng, L., Chen, W. *et al*. Integrative analysis of gene expression in response to low-dose ionizing radiation in a human skin model // Med Oncol. 32 (6): 621. (2015). 10.1007/s12032-015-0621-z
50. Burns, T. F., Bernhard, E. J., El-Deiry, W. S. Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo // Oncogene. 20 (34): 4601-4612. (2001). 10.1038/sj.onc.1204484
51. Barker, H. E., Paget, J. T., Khan, A. A. *et al*. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence // Nat Rev Cancer. 15 (7): 409-425. (2015). 10.1038/nrc3958
52. Салеева, Д. В., Михайлов, В. Ф., Рождественский, Л. М. *et al*. Анализ изменения активности генов, контролирующих регуляцию гемопоэза при формировании опухолей у облученных мышей // Доклады академии наук. Науки о жизни. 491 168-171. (2020).
53. Серебряный, А. М. О множественности механизмов формирования радиоадаптивного ответа у лимфоцитов периферической крови человека // Цитология. 57 (5): 319-329. (2015).
54. Lumniczky, K., Impens, N., Armengol, G. *et al*. Low dose ionizing radiation effects on the immune system // Environ Int. 149 106212. (2021). 10.1016/j.envint.2020.106212
55. Park, H. S., Seong, K. M., Kim, J. Y. *et al*. Chronic low-dose radiation inhibits the cells death by cytotoxic high-dose radiation increasing the level of AKT and acinus proteins via NF-kappaB activation // Int J Radiat Biol. 89 (5): 371-377. (2013). 10.3109/09553002.2013.754560
56. Neumaier, T., Swenson, J., Pham, C. *et al*. Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells // Proc Natl Acad Sci U S A. 109 (2): 443-448. (2012). 10.1073/pnas.1117849108
57. Shiraishi, K., Tachibana, A., Yonezawa, M. *et al*. Adaptive response of bone marrow stem cells induced by low-dose rate in C57BL/6 mice // International Congress Series. 1276 264-265. (2005). https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.12.008
58. Liang, X., So, Y. H., Cui, J. *et al*. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells // J Radiat Res. 52 (3): 380-386. (2011). 10.1269/jrr.10121
59. Засухина, Г. Д. Адаптивный ответ – общебиологическая закономерность: факты, гипотезы, вопросы // Радиационная биология. Радиоэкология. 48 (4): 464-473. (2008).
60. Fields, S., Jang, S. K. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein // Science. 249 (4972): 1046-1049. (1990). 10.1126/science.2144363
61. Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S. *et al*. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53 // Nature. 362 (6423): 857-860. (1993). 10.1038/362857a0
62. Riemenschneider, M. J., Buschges, R., Wolter, M. *et al*. Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification // Cancer Res. 59 (24): 6091-6096. (1999).
63. Urso, L., Calabrese, F., Favaretto, A. *et al*. Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment // Crit Rev Oncol Hematol. 97 220-230. (2016). 10.1016/j.critrevonc.2015.08.019

64. Shiloh, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity // Nat Rev Cancer. 3 (3): 155-168. (2003). 10.1038/nrc1011
65. Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A. *et al*. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy // J Biomed Biotechnol. 2012 170325. (2012). 10.1155/2012/170325
66. Pflaum, J., Schlosser, S., Muller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer // Front Oncol. 4 285. (2014). 10.3389/fonc.2014.00285
67. Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F. *et al*. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization // Int J Mol Sci. 17 (1): (2016). 10.3390/ijms17010102
68. Boutros, R., Lobjois, V., Ducommun, B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? // Nat Rev Cancer. 7 (7): 495-507. (2007). 10.1038/nrc2169
69. Hemmings, B. A., Restuccia, D. F. PI3K-PKB/Akt pathway // Cold Spring Harb Perspect Biol. 4 (9): a011189. (2012). 10.1101/cshperspect.a011189
70. Gao, T., Furnari, F., Newton, A. C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth // Mol Cell. 18 (1): 13-24. (2005). 10.1016/j.molcel.2005.03.008
71. Park, H. S., You, G. E., Yang, K. H. *et al*. Role of AKT and ERK pathways in controlling sensitivity to ionizing radiation and adaptive response induced by low-dose radiation in human immune cells // Eur J Cell Biol. 94 (12): 653-660. (2015). 10.1016/j.ejcb.2015.08.003
72. de Almagro, M. C., Vucic, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy // Exp Oncol. 34 (3): 200-211. (2012).
73. Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J. R. *et al*. The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo // Cell Cycle. 10 (14): 2380-2389. (2011). 10.4161/cc.10.14.16588
74. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link // Nat Rev Mol Cell Biol. 4 (7): 552-565. (2003). 10.1038/nrm1150
75. Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R. *et al*. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease // Biomed Res Int. 2014 616149. (2014). 10.1155/2014/616149
76. Krakstad, C., Chekenya, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics // Mol Cancer. 9 135. (2010). 10.1186/1476-4598-9-135
77. Засухина, Г. Д., Михайлов, В. Ф., Шуленина, Л. В. *et al*. Роль некодирующих РНК в клетках человека после воздействия ионизирующей радиации // Цитология. 59 (9): 563-573. (2017).
78. Zhang, Y., Xiong, Y., Yarbrough, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways // Cell. 92 (6): 725-734. (1998). 10.1016/s0092-8674(00)81401-4
79. Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R. *et al*. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death // Nature. 404 (6780): 892-897. (2000). 10.1038/35009130
80. Lopez, J., Meier, P. To fight or die - inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death // Curr Opin Cell Biol. 22 (6): 872-881. (2010). 10.1016/j.ceb.2010.08.025

81. Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J. *et al*. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins // Cell. 83 (7): 1243-1252. (1995). 10.1016/0092-8674(95)90149-3
82. Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V. *et al*. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation // J Biol Chem. 283 (36): 24295-24299. (2008). 10.1074/jbc.C800128200
83. Fulda, S., Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer // Nat Rev Drug Discov. 11 (2): 109-124. (2012). 10.1038/nrd3627
84. Martin, E. W., Chakraborty, S., Presman, D. M. *et al*. Assaying Homodimers of NF-kappaB in Live Single Cells // Front Immunol. 10 2609. (2019). 10.3389/fimmu.2019.02609
85. Torrealba, N., Vera, R., Fraile, B. *et al*. TGF-beta/PI3K/AKT/mTOR/NF-kB pathway. Clinicopathological features in prostate cancer // Aging Male. 23 (5): 801-811. (2020). 10.1080/13685538.2019.1597840
86. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. *et al*. NF-kappaB signaling in inflammation // Signal Transduct Target Ther. 2 (2017). 10.1038/sigtrans.2017.23
87. Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y. *et al*. Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation // Mol Cell. 38 (1): 101-113. (2010). 10.1016/j.molcel.2010.03.009
88. Serasanambati, M., Chilakapati, S. R. Function of Nuclear Factor kappa B (NF-kB) in human diseases-A Review // South Indian Journal Of Biological Sciences. 2 (4): 368-387. (2016). 10.22205/sijbs/2016/v2/i4/103443
89. Taniguchi, K., Karin, M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age // Nat Rev Immunol. 18 (5): 309-324. (2018). 10.1038/nri.2017.142
90. Sun, S. C. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation // Nat Rev Immunol. 17 (9): 545-558. (2017). 10.1038/nri.2017.52
91. Ma, D., Lian, F., Wang, X. PLCG2 promotes hepatocyte proliferation in vitro via NF-kappaB and ERK pathway by targeting bcl2, myc and ccnd1 // Artif Cells Nanomed Biotechnol. 47 (1): 3786-3792. (2019). 10.1080/21691401.2019.1669616
92. Singh, V., Gupta, D., Arora, R. NF-kB as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures // Discoveries (Craiova). 3 (1): e35. (2015). 10.15190/d.2015.27
93. Xia, Y., Padre, R. C., De Mendoza, T. H. *et al*. Phosphorylation of p53 by IkappaB kinase 2 promotes its degradation by beta-TrCP // Proc Natl Acad Sci U S A. 106 (8): 2629-2634. (2009). 10.1073/pnas.0812256106
94. Zhang, L., Huang, C., Guo, Y. *et al*. MicroRNA-26b Modulates the NF-κB Pathway in Alveolar Macrophages by Regulating PTEN // The Journal of Immunology. 195 (11): 5404-5414. (2015). 10.4049/jimmunol.1402933
95. Komarova, E. A., Krivokrysenko, V., Wang, K. *et al*. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice // FASEB J. 19 (8): 1030-1032. (2005). 10.1096/fj.04-3213fje
96. Chaudhry, M. A. Analysis of gene expression in normal and cancer cells exposed to gamma-radiation // J Biomed Biotechnol. 2008 541678. (2008). 10.1155/2008/541678
97. Jeong, Y., Hoang, N. T., Lovejoy, A. *et al*. Role of KEAP1/NRF2 and TP53 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma Development and Radiation Resistance // Cancer Discov. 7 (1): 86-101. (2017). 10.1158/2159-8290.CD-16-0127

98. Morgan, M. J., Liu, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling // Cell Res. 21 (1): 103-115. (2011). 10.1038/cr.2010.178
99. Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C. *et al*. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide // J Immunol. 166 (6): 3873-3881. (2001). 10.4049/jimmunol.166.6.3873
100. Simon, P. S., Sharman, S. K., Lu, C. *et al*. The NF-kappaB p65 and p50 homodimer cooperate with IRF8 to activate iNOS transcription // BMC Cancer. 15 770. (2015). 10.1186/s12885-015-1808-6
101. Singh, V. K., Fatanmi, O. O., Singh, P. K. *et al*. Role of radiation-induced granulocyte colony-stimulating factor in recovery from whole body gamma-irradiation // Cytokine. 58 (3): 406-414. (2012). 10.1016/j.cyto.2012.03.011
102. Liu, L., Liu, Y., Yan, X. *et al*. The role of granulocyte colonystimulating factor in breast cancer development: A review // Mol Med Rep. 21 (5): 2019-2029. (2020). 10.3892/mmr.2020.11017
103. Yang, J. F., Shi, S. N., Xu, W. H. *et al*. Screening, identification and validation of CCND1 and PECAM1/CD31 for predicting prognosis in renal cell carcinoma patients // Aging (Albany NY). 11 (24): 12057-12079. (2019). 10.18632/aging.102540
104. Liang, M. L., Hsieh, T. H., Liu, Y. R. *et al*. Significance of cyclin D1 overexpression in progression and radio-resistance of pediatric ependymomas // Oncotarget. 9 (2): 2527-2542. (2018). 10.18632/oncotarget.23509
105. Gorjala, P., Cairncross, J. G., Gary, R. K. p53-dependent up-regulation of CDKN1A and down-regulation of CCNE2 in response to beryllium // Cell Prolif. 49 (6): 698-709. (2016). 10.1111/cpr.12291
106. Geng, Y., Yu, Q., Whoriskey, W. *et al*. Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia // Proc Natl Acad Sci U S A. 98 (23): 13138-13143. (2001). 10.1073/pnas.231487798
107. Chen, C. Y., Chen, J., He, L. *et al*. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator // Front Endocrinol (Lausanne). 9 338. (2018). 10.3389/fendo.2018.00338
108. Faurschou, A., Gniadecki, R., Calay, D. *et al*. TNF-alpha impairs the S-G2/M cell cycle checkpoint and cyclobutane pyrimidine dimer repair in premalignant skin cells: role of the PI3K-Akt pathway // J Invest Dermatol. 128 (8): 2069-2077. (2008). 10.1038/jid.2008.19
109. Trotman, L. C., Pandolfi, P. P. PTEN and p53: who will get the upper hand? // Cancer Cell. 3 (2): 97-99. (2003). 10.1016/s1535-6108(03)00022-9
110. Feng, X. J., Liu, S. X., Wu, C. *et al*. The PTEN/PI3K/Akt signaling pathway mediates HMGB1-induced cell proliferation by regulating the NF-kappaB/cyclin D1 pathway in mouse mesangial cells // Am J Physiol Cell Physiol. 306 (12): C1119-1128. (2014). 10.1152/ajpcell.00385.2013
111. Brandmaier, A., Hou, S. Q., Shen, W. H. Cell Cycle Control by PTEN // J Mol Biol. 429 (15): 2265-2277. (2017). 10.1016/j.jmb.2017.06.004
112. Engreitz, J. M., Haines, J. E., Perez, E. M. *et al*. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing // Nature. 539 (7629): 452-455. (2016). 10.1038/nature20149
113. Chang, P. Y., Draheim, K., Kelliher, M. A. *et al*. NFKB1 is a direct target of the TAL1 oncoprotein in human T leukemia cells // Cancer Res. 66 (12): 6008-6013. (2006). 10.1158/0008-5472.CAN-06-0194

114. Lang, F., Li, X., Zheng, W. *et al*. CTCF prevents genomic instability by promoting homologous recombination-directed DNA double-strand break repair // Proc Natl Acad Sci U S A. 114 (41): 10912-10917. (2017). 10.1073/pnas.1704076114
115. Tanwar, V. S., Jose, C. C., Cuddapah, S. Role of CTCF in DNA damage response // Mutat Res. 780 61-68. (2019). 10.1016/j.mrrev.2018.02.002
116. Fiorentino, F. P., Giordano, A. The tumor suppressor role of CTCF // J Cell Physiol. 227 (2): 479-492. (2012). 10.1002/jcp.22780
117. Docquier, F., Farrar, D., D'Arcy, V. *et al*. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis // Cancer Res. 65 (12): 5112-5122. (2005). 10.1158/0008-5472.CAN-03-3498
118. Zhang, P., Wu, W., Chen, Q. *et al*. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks // J Integr Bioinform. 16 (3): (2019). 10.1515/jib-2019-0027
119. Foggin, S., Mesquita-Ribeiro, R., Dajas-Bailador, F. *et al*. Biological Significance of microRNA Biomarkers in ALS-Innocent Bystanders or Disease Culprits? // Front Neurol. 10 578. (2019). 10.3389/fneur.2019.00578
120. Yao, R. W., Wang, Y., Chen, L. L. Cellular functions of long noncoding RNAs // Nat Cell Biol. 21 (5): 542-551. (2019). 10.1038/s41556-019-0311-8
121. Schmitt, A. M., Chang, H. Y. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways // Cancer Cell. 29 (4): 452-463. (2016). 10.1016/j.ccell.2016.03.010
122. miRBase. 2010. http://www.mirbase.org/index.shtml, дата обращения: 24.02.2021.
123. LncBook a curated knowledgebase of human long non-coding. 2021. http://bigd.big.ac.cn/lncbook/index, дата обращения: 24.02.2021.
124. Шуленина, Л. В., Михайлов, В. Ф., Васильева, И. М. *et al*. Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. (1): 103-111. (2019).
125. Mele, M., Mattioli, K., Mallard, W. *et al*. Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs // Genome Res. 27 (1): 27-37. (2017). 10.1101/gr.214205.116
126. O'Leary, V. B., Ovsepian, S. V., Carrascosa, L. G. *et al*. PARTICLE, a Triplex-Forming Long ncRNA, Regulates Locus-Specific Methylation in Response to Low-Dose Irradiation // Cell Rep. 11 (3): 474-485. (2015). 10.1016/j.celrep.2015.03.043
127. Михайлов, В. Ф., Шуленина, Л. В., Васильева, И. М. *et al*. Некоторые аспекты канцерогенеза, связанные с генетическими и эпигенетическими факторами // Успехи современной биологии. 138 (5): 427-445. (2018).
128. Amin, S., Bathe, O. F. Response biomarkers: re-envisioning the approach to tailoring drug therapy for cancer // BMC Cancer. 16 (1): 850. (2016). 10.1186/s12885-016-2886-9
129. Ghidini, M., Hahne, J. C., Frizziero, M. *et al*. MicroRNAs as Mediators of Resistance Mechanisms to Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors in Solid Tumours // Target Oncol. 13 (4): 423-436. (2018). 10.1007/s11523-018-0580-3
130. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G. *et al*. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine // Mol Ther Nucleic Acids. 8 132-143. (2017). 10.1016/j.omtn.2017.06.005
131. Li, Z. X., Zhu, Q. N., Zhang, H. B. *et al*. MALAT1: a potential biomarker in cancer // Cancer Manag Res. 10 6757-6768. (2018). 10.2147/CMAR.S169406

132. West, J. A., Davis, C. P., Sunwoo, H. *et al*. The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites // Mol Cell. 55 (5): 791-802. (2014). 10.1016/j.molcel.2014.07.012
133. Yuan, C., Wang, D., Zhang, N. *et al*. DNA damage/cGAS-triggered up-regulation of MALAT1 promotes undesirable inflammatory responses in radiotherapy of cancer // Biochem Biophys Res Commun. 528 (4): 746-752. (2020). 10.1016/j.bbrc.2020.05.064
134. Chen, H., Wang, X., Yan, X. *et al*. LncRNA MALAT1 regulates sepsis-induced cardiac inflammation and dysfunction via interaction with miR-125b and p38 MAPK/NFkappaB // Int Immunopharmacol. 55 69-76. (2018). 10.1016/j.intimp.2017.11.038
135. Li, F., Lv, J. H., Liang, L. *et al*. Downregulation of microRNA-21 inhibited radiation-resistance of esophageal squamous cell carcinoma // Cancer Cell Int. 18 39. (2018). 10.1186/s12935-018-0502-6
136. Marin-Bejar, O., Marchese, F. P., Athie, A. *et al*. Pint lincRNA connects the p53 pathway with epigenetic silencing by the Polycomb repressive complex 2 // Genome Biol. 14 (9): R104. (2013). 10.1186/gb-2013-14-9-r104
137. Sharma, S., Munger, K. Expression of the Long Noncoding RNA DINO in Human Papillomavirus-Positive Cervical Cancer Cells Reactivates the Dormant TP53 Tumor Suppressor through ATM/CHK2 Signaling // mBio. 11 (3): (2020). 10.1128/mBio.01190-20
138. Schmitt, A. M., Garcia, J. T., Hung, T. *et al*. An inducible long noncoding RNA amplifies DNA damage signaling // Nat Genet. 48 (11): 1370-1376. (2016). 10.1038/ng.3673
139. Liu, H. Y., Zhang, Y. Y., Zhu, B. L. *et al*. miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT // Eur Rev Med Pharmacol Sci. 23 (10): 4149-4155. (2019). 10.26355/eurrev_201905_17917
140. Tian, Y., Fu, S., Qiu, G. B. *et al*. MicroRNA-27a promotes proliferation and suppresses apoptosis by targeting PLK2 in laryngeal carcinoma // BMC Cancer. 14 678. (2014). 10.1186/1471-2407-14-678
141. Tang, W., Zhu, J., Su, S. *et al*. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival // PLoS One. 7 (12): e51702. (2012). 10.1371/journal.pone.0051702
142. Tanaka, K., Miyata, H., Sugimura, K. *et al*. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts // Carcinogenesis. 36 (8): 894-903. (2015). 10.1093/carcin/bgv067
143. Morelli, E., Leone, E., Cantafio, M. E. *et al*. Selective targeting of IRF4 by synthetic microRNA-125b-5p mimics induces anti-multiple myeloma activity in vitro and in vivo // Leukemia. 29 (11): 2173-2183. (2015). 10.1038/leu.2015.124
144. Yuan, M., Da Silva, A., Arnold, A. *et al*. MicroRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma // Sci Rep. 8 (1): 12506. (2018). 10.1038/s41598-018-30942-4
145. Jeggo, P. A., Geuting, V., Lobrich, M. The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair // Radiother Oncol. 101 (1): 7-12. (2011). 10.1016/j.radonc.2011.06.019
146. Arnold, C. R., Mangesius, J., Skvortsova, II *et al*. The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance // Front Oncol. 10 164. (2020). 10.3389/fonc.2020.00164

147. Миронова, Н. Л.: Механизмы подавления прогрессии экспериментальных опухолей под действием дендритных клеток и природных нуклеаз. Дис. док. биол. наук: 03.01.04 -Новосибирск; 2018.
148. Шуленина, Л. В.: Изучение экспрессии микроРНК, модулирующих функциональную активность p53-зависимой системы защиты генома, при формировании отдаленных последствий радиационного воздействия у экспериментальных животных и человека. Дис. канд. биол. наук: 03.01.01 - Москва; 2015.
149. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J. *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Res. 33 (20): e179. (2005). 10.1093/nar/gni178
150. Primer-BLAST. NCBI/ Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast, дата обращения: 17.02.2020.
151. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. 25 (4): 402-408. (2001). 10.1006/meth.2001.1262
152. Software.informer. STATISTICA 7.0. . 2017. https://statistica.software.informer.com/7.0/.
153. Barbato, C., Pezzola, S., Caggiano, C. *et al*. A lentiviral sponge for miR-101 regulates RanBP9 expression and amyloid precursor protein metabolism in hippocampal neurons // Front Cell Neurosci. 8 37. (2014). 10.3389/fncel.2014.00037
154. Folini, M., Gandellini, P., Longoni, N. *et al*. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer // Mol Cancer. 9 12. (2010). 10.1186/1476-4598-9-12
155. Hunt, S., Jones, A. V., Hinsley, E. E. *et al*. MicroRNA-124 suppresses oral squamous cell carcinoma motility by targeting ITGB1 // FEBS Lett. 585 (1): 187-192. (2011). 10.1016/j.febslet.2010.11.038
156. Shi, Y., Wang, J., Chandarlapaty, S. *et al*. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1 // Nat Struct Mol Biol. 21 (6): 522-527. (2014). 10.1038/nsmb.2828
157. Arantes, L. M., Laus, A. C., Melendez, M. E. *et al*. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol // Oncotarget. 8 (6): 9911-9921. (2017). 10.18632/oncotarget.14253
158. Li, W. Q., Yu, H. Y., Zhong, N. Z. *et al*. miR27a suppresses the clonogenic growth and migration of human glioblastoma multiforme cells by targeting BTG2 // Int J Oncol. 46 (4): 1601-1608. (2015). 10.3892/ijo.2015.2843
159. Zhang, L., Yu, D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 1871 (2): 455-468. (2019). 10.1016/j.bbcan.2019.04.004
160. Hayes, J., Thygesen, H., Droop, A. *et al*. Prognostic microRNAs in high-grade glioma reveal a link to oligodendrocyte precursor differentiation // Oncoscience. 2 (3): 252-262. (2015). 10.18632/oncoscience.112
161. Yu, Q., Li, B., Li, P. *et al*. Plasma microRNAs to predict the response of radiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma patients // Am J Transl Res. 7 (10): 2060-2071. (2015).
162. Yu, X., Li, Z., Zheng, H. *et al*. NEAT1: A novel cancer-related long non-coding RNA // Cell Prolif. 50 (2): (2017). 10.1111/cpr.12329

163. Qu, C. H., Sun, Q. Y., Zhang, F. M. *et al*. Long non-coding RNA ROR is a novel prognosis factor associated with non-small-cell lung cancer progression // Eur Rev Med Pharmacol Sci. 21 (18): 4087-4091. (2017).
164. Zhang, A., Zhou, N., Huang, J. *et al*. The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage // Cell Res. 23 (3): 340-350. (2013). 10.1038/cr.2012.164
165. Yao, W., Bai, Y., Li, Y. *et al*. Upregulation of MALAT-1 and its association with survival rate and the effect on cell cycle and migration in patients with esophageal squamous cell carcinoma // Tumour Biol. 37 (4): 4305-4312. (2016). 10.1007/s13277-015-4223-3
166. Li, M., Tian, L., Ren, H. *et al*. MicroRNA-101 is a potential prognostic indicator of laryngeal squamous cell carcinoma and modulates CDK8 // J Transl Med. 13 271. (2015). 10.1186/s12967-015-0626-6
167. Samsonov, R., Burdakov, V., Shtam, T. *et al*. Plasma exosomal miR-21 and miR-181a differentiates follicular from papillary thyroid cancer // Tumour Biol. 37 (9): 12011-12021. (2016). 10.1007/s13277-016-5065-3
168. Jiang, L., Zeng, X., Yang, H. *et al*. Oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1): a regulator for the cell growth and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma // Int J Cancer. 123 (8): 1779-1786. (2008). 10.1002/ijc.23734
169. Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R. *et al*. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line // BMC Genomics. 19 (1): 334. (2018). 10.1186/s12864-018-4718-6
170. Yuan, D., Pan, Y., Zhang, J. *et al*. Role of nuclear factor-kappaB and P53 in radioadaptive response in Chang live cells // Mutat Res. 688 (1-2): 66-71. (2010). 10.1016/j.mrfmmm.2010.03.010
171. Oppenheim, A., Lahav, G. The puzzling interplay between p53 and Sp1 // Aging (Albany NY). 9 (5): 1355-1356. (2017). 10.18632/aging.101238
172. Boominathan, L. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex // PLoS One. 5 (5): e10615. (2010). 10.1371/journal.pone.0010615
173. Hennessy, E. J., Sheedy, F. J., Santamaria, D. *et al*. Toll-like receptor-4 (TLR4) down-regulates microRNA-107, increasing macrophage adhesion via cyclin-dependent kinase 6 // J Biol Chem. 286 (29): 25531-25539. (2011). 10.1074/jbc.M111.256206
174. Maqbool, R., Lone, S. N., Ul Hussain, M. Post-transcriptional regulation of the tumor suppressor p53 by a novel miR-27a, with implications during hypoxia and tumorigenesis // Biochem J. 473 (20): 3597-3610. (2016). 10.1042/BCJ20160359
175. Adriaens, C., Standaert, L., Barra, J. *et al*. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity // Nat Med. 22 (8): 861-868. (2016). 10.1038/nm.4135
176. Grossi, E., Sanchez, Y., Huarte, M. Expanding the p53 regulatory network: LncRNAs take up the challenge // Biochim Biophys Acta. 1859 (1): 200-208. (2016). 10.1016/j.bbagrm.2015.07.011
177. Boaventura, P., Duraes, C., Mendes, A. *et al*. Is Low-Dose Radiation Exposure a Risk Factor for Atherosclerotic Disease? // Radiat Res. 189 (4): 418-424. (2018). 10.1667/RR14942.1
178. Yen, P. N., Lin, I. F., Chang, W. P. *et al*. Risk factors of depression after prolonged low-dose rate environmental radiation exposure // Int J Radiat Biol. 90 (10): 859-866. (2014). 10.3109/09553002.2014.916830

179. Михайлов, В. Ф., Засухина, Г. Д. Новый подход к стимуляции защитных систем организма малыми дозами радиации // Успехи современной биологии. 140 (3): 244-252. (2020).
180. Пелевина, И. И., Алещенко, А. В., Антощина, М. М. *et al*. О некоторых путях формирования радиационно-индуцированного адаптивного ответа // Радиационная биология. Радиоэкология. 57 (6): 565-572. (2017).
181. Tang, F. R., Loke, W. K. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability // Int J Radiat Biol. 91 (1): 13-27. (2015). 10.3109/09553002.2014.937510
182. Шуленина, Л. В., Михайлов, В. Ф., Васильева, И. М. *et al*. МикроРНК в крови пациентов с раком предстательной железы как возможный показатель ранних осложнений лучевой терапии // Радиационная биология. Радиоэкология. 57 (6): 598-607. (2017).
183. Calabrese, E. J. Low doses of radiation can enhance insect lifespans // Biogerontology. 14 (4): 365-381. (2013). 10.1007/s10522-013-9436-5
184. Hong, J. Y., Han, K., Jung, J. H. *et al*. Association of Exposure to Diagnostic Low-Dose Ionizing Radiation With Risk of Cancer Among Youths in South Korea // JAMA Netw Open. 2 (9): e1910584. (2019). 10.1001/jamanetworkopen.2019.10584
185. Михайлов, В. Ф., Шуленина, Л. В., Раева, Н. Ф. *et al*. Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека // Цитология. 61 (6): 427-438. (2019).
186. Sun, Y., Tran, B. N., Worley, L. A. *et al*. Functional analysis of the p53 pathway in response to ionizing radiation in uveal melanoma // Invest Ophthalmol Vis Sci. 46 (5): 1561-1564. (2005). 10.1167/iovs.04-1362
187. Feng, H., Zhang, J., Shi, Y. *et al*. Long noncoding RNA LINC-PINT is inhibited in gastric cancer and predicts poor survival // J Cell Biochem. 120 (6): 9594-9600. (2019). 10.1002/jcb.28236
188. Bautista-Sanchez, D., Arriaga-Canon, C., Pedroza-Torres, A. *et al*. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics // Mol Ther Nucleic Acids. 20 409-420. (2020). 10.1016/j.omtn.2020.03.003
189. Malachowska, B., Tomasik, B., Stawiski, K. *et al*. Circulating microRNAs as Biomarkers of Radiation Exposure: A Systematic Review and Meta-Analysis // Int J Radiat Oncol Biol Phys. 106 (2): 390-402. (2020). 10.1016/j.ijrobp.2019.10.028
190. Qi, Z., Guo, S., Li, C. *et al*. Integrative Analysis for the Roles of lncRNAs in the Immune Responses of Mouse PBMC Exposed to Low-Dose Ionizing Radiation // Dose Response. 18 (1): 1559325820913800. (2020). 10.1177/1559325820913800
191. Jiang, Y., Jin, S., Tan, S. *et al*. Long noncoding RNA NEAT1 regulates radio-sensitivity via microRNA-27b-3p in gastric cancer // Cancer Cell Int. 20 (1): 581. (2020). 10.1186/s12935-020-01655-4
192. Салеева, Д. В., Михайлов, В. Ф., Шуленина, Л. В. *et al*. Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток, у больных раком гортани // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 62 (4): 67-74. (2018). https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.67-74
193. Vo, D. T., Karanam, N. K., Ding, L. *et al*. miR-125a-5p Functions as Tumor Suppressor microRNA And Is a Marker of Locoregional Recurrence And Poor prognosis in Head And Neck Cancer // Neoplasia. 21 (9): 849-862. (2019). 10.1016/j.neo.2019.06.004

194. Orlowski, R. Z., Baldwin, A. S., Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer // Trends Mol Med. 8 (8): 385-389. (2002). 10.1016/s1471-4914(02)02375-4
195. Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B. *et al*. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes // Nature. 414 (6861): 313-317. (2001). 10.1038/35104568
196. Sonis, S. T. The pathobiology of mucositis // Nat Rev Cancer. 4 (4): 277-284. (2004). 10.1038/nrc1318
197. Chen, L., Yuan, D., Yang, Y. *et al*. LincRNA-p21 enhances the sensitivity of radiotherapy for gastric cancer by targeting the beta-catenin signaling pathway // J Cell Biochem. 120 (4): 6178-6187. (2019). 10.1002/jcb.27905
198. Li, S., Li, J., Chen, C. *et al*. Pan-cancer analysis of long non-coding RNA NEAT1 in various cancers // Genes Dis. 5 (1): 27-35. (2018). 10.1016/j.gendis.2017.11.003
199. Zheng, Z., Qu, J. Q., Yi, H. M. *et al*. MiR-125b regulates proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma by targeting A20/NF-kappaB signaling pathway // Cell Death Dis. 8 (6): e2855. (2017). 10.1038/cddis.2017.211
200. Zeng, C., Liu, S., Lu, S. *et al*. The c-Myc-regulated lncRNA NEAT1 and paraspeckles modulate imatinib-induced apoptosis in CML cells // Mol Cancer. 17 (1): 130. (2018). 10.1186/s12943-018-0884-z
201. Pedroza-Torres, A., Campos-Parra, A. D., Millan-Catalan, O. *et al*. MicroRNA-125 modulates radioresistance through targeting p21 in cervical cancer // Oncol Rep. 39 (3): 1532-1540. (2018). 10.3892/or.2018.6219
202. Chen, Y., Cui, J., Gong, Y. *et al*. MicroRNA: a novel implication for damage and protection against ionizing radiation // Environ Sci Pollut Res Int. 28 (13): 15584-15596. (2021). 10.1007/s11356-021-12509-5
203. Schubauer-Berigan, M. K., Daniels, R. D., Bertke, S. J. *et al*. Cancer Mortality through 2005 among a Pooled Cohort of U.S. Nuclear Workers Exposed to External Ionizing Radiation // Radiat Res. 183 (6): 620-631. (2015). 10.1667/RR13988.1
204. Булдаков, Л. А., Калистратова, В. С. Радиационное воздействие на организм – положительные эффекты / Москва. Информ-Атом. 2005.
205. Cuttler, J. M., Moore, E. R., Hosfeld, V. D. *et al*. Update on a Patient With Alzheimer Disease Treated With CT Scans // Dose Response. 15 (1): 1559325817693167. (2017). 10.1177/1559325817693167
206. Kojima, S., Tsukimoto, M., Shimura, N. *et al*. Treatment of Cancer and Inflammation With Low-Dose Ionizing Radiation: Three Case Reports // Dose Response. 15 (1): 1559325817697531. (2017). 10.1177/1559325817697531

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица S1. Масса органов мышей в эксперименте с перевивной карциномой Льюиса после 2х облучений

№	Группа	Масса селезенки, мг	Масса тимуса, мг	Масса опухоли, мг	Масса печени, мг
1	биоконтроль	77	31,2	-	-
2		101	33,7	-	-
3		99	38,2	-	-
4		83	44,7	-	-
5	облучение	105	57,4	608	-
6		91	62,7	998	-
7		127	87,4	802	-
8		103	61,9	993	-
9		99	44,6	1052	-
10		89	49,9	1737	-
11	обл+опух	111	42,1	566	-
12		121	62,9	1548	-
13		137	94,5	1549	-
14		87	59,6	нет опухоли	-
15		121	85,8	1691	-
16		125	59,6	2597	-

Таблица S2. Масса органов мышей в эксперименте с перевивной карциномой Льюиса после 4х облучений

№	Группа	Масса селезенки, мг	Масса тимуса, мг	Масса опухоли, мг	Масса печени, мг
1	биоконтроль	93	50,8		86,2
2		83	49,8		65,2
3		99	21,1		61,2
4		97	53,3		120,6
5	облучение	271	23,0	90,5	114,9
6		110	34,0	95,2	113,7
7		189	13,6	107,8	107,9
8		271	17,1	106,2	0,747 (язва)
9		187	20,1	90,6	93,7
10		155	12,8	99,5	81,8
11	обл+опух	165	41,3	97,6	109,5
12		219	40,2	90,3	110,5
13		219	22,3	93,6	130,4
14		143	23,9	95,7	116,39
15		165	9,1	90,3	105,3
16		159	26,2	91,8	111,4

Таблица S3. Олигонуклеотидная последовательность — stem-loop праймеров для микроРНК мыши и человека

МикроРНК	Последовательность “stem-loop” праймеров и их концентрация
Мышь	
miR-21	L- 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC ACTGGATACGACTCAACAT-3' (51) **50нМ**
miR-125b	L- 5′-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTC AGTTGAGTCACAAGT-3’ (44) **50нМ**
Человек	
miR-21	L-5’-GTCGTATCCAGTGCGTGTCGTGGAGTCGGC AATTGCACTGGATACGACACAGC CCA-3’ (57) **200нМ**
miR-27a	L-5’-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATT CAGTTGAGGCGGAACT-3’ (44) **50нМ**
miR-34	L-5’- GTCGTATCCAGTGCTGGGTCCGAGTGA TTCGCACTGGATACGACACAA CCA-3’ (51) **50нМ**
miR-101	L-5′- CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTC AGTTGAGTTCAGTTA-3′ (44) **50нМ**
miR-107	5'-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTC AGTTGAGTGATAGCC-3' **50нМ**
miR-124	L- 5′-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACATCA AG-3’(50) **50нМ**
miR-125b	L- 5′ -GTCGTATCCAGTGCAGGGTC CGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC TCACAA-3′ (50) **50нМ**
miR-181a	L-5′ -GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGAC ACTCACC-3′ (51) **50нМ**

Таблица S4. Температурно-временной режим ПЦР в реальном времени для мРНК и микроРНК

Ген	Метод ПЦР в реальном времени	Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зондов и их концентрации	Условия ПЦР в реальном времени
Мышь			
P53	Sybr Green	F: 5'-TCT GGG ACA GCC AAG TCT GT-3' (20) R: 5'- GGAGTCTTCCAGTGTCATGA-3' (20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин 2. **35 циклов:** 94^0C-30c $51,9^0$C-50c 72^0C-80c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
PTEN	Sybr Green	F: 5′-AAT TCC CAG TCA GAG GCG CTA TGT-3′ (24) R: 5′-GAT TGC AAG TTC CGC CAC TGA ACA-3′ (24) **100нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-20c 64^0C-20c 3. 55^0C- 15c Δt 45циклов
p38α	TaqMan	F: 5'-AAGGGAACGAGAAAACTGCTGTT -3' (23) R: 5'-TATTTTAACCAGTGGTATTATCTGACA-TCCT-3' (31) **FAM**-TTGTATTTGTGAACTTGGCTGTAA TCT GGTATGCC-TAMRA **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-20c 59^0C-45c 72^0C-20c 3. 55^0C- 15c Δt 45циклов
TAL1	Sybr Green	F: 5'-CTGTGTCAATCCAGGTGGTG-3' (20) R: 5'-GATGGGGCCTTTGGATATTT-3' (20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-30c 62^0C-30c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
CTCF	Sybr Green	F: 5'-CGCGAAGAATGACCACAAAT-3' (20) R: 5'-GACTCCTCCACAATGGCTTC-3' (20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c $51,4^0$C-45c 72^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
Cyclin E2	Sybr Green	F: 5'-AGGAATCAGCCCTTGCATTATC-3' (20) R: 5'-CCCAGCTTAAATCTGGCAGAG-3' (21) **200нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-30c 58^0C-20c 72^0C-20c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов

Таблица S4. Продолжение

Ген	Метод ПЦР в реальном времени	Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зондов и их концентрации	Условия ПЦР в реальном времени
G-SCF	Sybr Green	F: 5′-CTCAACTTTCTGCCCAGAGG-3′ (20) R: 5′-AGCTGGCTTAGGCACTGTGT-3′ (20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15с 56^0C-30с 72^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов
TNFa	Sybr Green	F: 5'-CCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3' (21) R: 5'-TTGATGGCAGAGAGGAGGTT-3' (20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15с 55^0C-30с 72^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов
IAP1	Sybr Green	F: 5′-TTCTGTACTGGCCACCTAGTGTTC-3′(24) R: 5′-CATCATTGCGATCCACGTAATAG-3′(23) **300нМ**	1. 95^0C- 2 мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15с 60^0C-30с 70^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов
IAP2	Sybr Green	F: 5′-ATGTCAGAGCACCAGAGGC ATT-3′ (22) R: 5′-AGAGACAGTGTATCTCGAAG CAGAT-3′(25) **300нМ**	1. 95^0C- 2 мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15с 60^0C-30с 70^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов
IkBa	Sybr Green	F: 5′-CGCTTGGTGGACGATCG-3′ (17) R: 5′-TTGCTCGTACTCCTCGTCCTTC-3′ (22) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин 2. **45 циклов**: 95^0C-15с 59^0C-30с 72^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов
iNOS	Sybr Green	F: 5′-CTATCAGGAAGAAATGCAGGA GAT-3′ (24) R: 5′-GAGCACGCTGAGTACCTCATT-3′ (21) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин 2. **45 циклов**: 95^0C-15с 61^0C-30с 72^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов
NFkB(p50)	Sybr Green	F: 5′-GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC-3′ (24) R: 5′-ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG-3′ (24) **600нМ**	1. 95^0C- 2 мин 2. **40 циклов**: 95^0C-15с 60^0C-30с 70^0C-30с 3. 55^0C- 15с Δt 40циклов

Таблица S4. Продолжение

Ген	Метод ПЦР в реальном времени	Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зондов и их концентрации	Условия ПЦР в реальном времени
NFkB(p65)	Sybr Green	F: 5’-CTTCCTCAGCCATGGTACCTCT-3’ (22) R: 5’-CAAGTCTTCATCAGCATCAAACTG-3’ (24) **300нМ**	1. 95^0C- 2 мин 2. **45 циклов**: 95^0C-30c 60^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
PINT	Sybr Green	F: 5'-TCCTCTGGAGTGAGGAGGAA-3' (20) R: 5'-CCTGTCTCAGAGTCCCCATC-3' (20) **200нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 56^0C-45c 72^0C-20c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
MALAT1	Sybr Green	F: 5'- AGCGAGTTGGTGATGAAG-3′ (18) R: 5'-TGCCGACCTCAAGGAATGT TAC-3′ (22) **300нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-10c 60^0C-45c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
DINO	Sybr Green	F: 5′- GCAATGGTGTGCCTGACTAT -3’(20) R: 5′- ACTTCTGGCTTCCCAGAG -3’(18) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-15c 60^0C-45c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
lncp21	Sybr Green	F: 5′- CCTGTCCACTCGCTTTC-3’(17) R: 5′-GGAACTGGAGACGGAATGTC-3’(20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 50^0C-35c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
NEAT1	Sybr Green	F: 5'-GCTCTGGGACCTTCGTGACTCT-3' (22) R: 5'-CTGCCTTGGCTTGGAAATGTAA-3'(22) **100нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 94^0C-10c 60^0C-45c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
miR-21	Sybr Green	F: 5'-TGCCGCCTAGCTTATCAGACTG-3' (22) R: AGTGCAGGGTCCGAGG-3' (16) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 94^0C-20c 57^0C-45c 72^0C- 45c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
miR-125b	Sybr Green	F: 5’-ACACTCCAGCTGGGTCCCTGAG ACCCTAAC-3' (30) R: 5′-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC GGCAATTCAGTTGAG-3' (36) **250нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 30 циклов:** 94^0C-15c 60^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов

Таблица S4. Продолжение

GAPDH	Sybr Green	F: 5′-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3′ (21) R: 5′-ACGGACACATTGGGGGTAGG -3′ (20) **100нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-20c 60^0C-25c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
L24	Sybr Green	F: 5′- CCAAACCTGAATTTCCTAGAGC -3′ (22) R: 5′- GTTTTAGAAAAAAGGCCTC TAC-3′ (22) **200нМ**	1. 50^0C- 2 мин 94^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-15c 60^0C-25c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
Человек			
P53	Sybr Green	F- 5′- GCCCCCAGGGAGCACTA-3′ (17) R- 5′-GGGAGAGGAGCTGGTGTTG-3′ (19) **200нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-45c 72^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 40циклов
CCND1	Sybr Green	F-5′- GATCAAGTGTGACCCGGACT-3′(20) R-5′- TCCTCCTCCTCTTCCTCCTC -3′(20) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 58^0C-30c 72^0C-30c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
ORAOV1	Sybr Green	F-5′ -CTGCTTGCCGCTATGGCTG-3′(19) R-5′ - TTCGGTCTCTGTTCATCCATCC-3′ (22) **300нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 30 циклов:** 94^0C-30c 55^0C-30c 72^0C-35c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
PTEN	Sybr Green	F-5′-CAAGATGATGTTTGAAACTAT TCCAATG-3′ (28) R-5′-CCTTTAGCTGGCAGACCACCA-3′ (21) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-20c 72^0C-40c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
SP1	Sybr Green	F-5′-CCACCATGAGCGACCAAGAT-3′ (20) R-5′-TGAAAAGGCACCACCACCAT-3′ (20) **100нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 94^0C-30c 52^0C-15c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
RhoA	Sybr Green	F-5′ -CGCTTTTGGGTACATGGAGT-3′ (20) R-5′ -CAAGACAAGGCACCCAGATT-3′ (20) **200нМ**	1. 95^0C- 5мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов

Таблица S4. Продолжение

Cdc42	Sybr Green	F-5’-GCCCGTGACCTGAAGGCTGTCA-3’ (22) R-5’-TGCTTTTAGTATGATGCCGACACCA-3’(25) **300нМ**	1. 95^0C- 5мин **2. 40 циклов:** 94^0C-15c 66^0C-40c 72^0C-30c 55^0C- 15c Δt 50циклов
NFkB(p65)	Sybr Green	F-5’-GTTCACAGACCTGGCATCC-3’ (19) R-5’-TGTCACTAGGCGAGTTATAGC-3’ (21) **300нМ**	3. 94^0C- 2 мин **4. 40 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-30c 70^0C-30c 55^0C- 15c Δt 50циклов
IAP1	Sybr Green	F-5’-CTACAATGGAGTGCTCATCTG-3’ (21) R-5’-CAGCCAGAGGCGATATTCATC-3’ (21) **300нМ**	5. 94^0C- 2 мин **6. 40 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-30c 70^0C-30c 7. 55^0C- 15c Δt 50циклов
Il6	Sybr Green	F-5’-GCCTTCGGTCCAGTTGCCTT-3’ (20) R-5’-AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3’ (22) **300нМ**	1. 94^0C- 2 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-15c 51^0C-30c 70^0C-30c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
IRAK1	Sybr Green TaqMan	F-5’-ACTGGCCCTTGGCAGCTC-3’ (18) R-5’- GGCCAGCTTCTGGACCATC-3’ (19) **300нМ** TaqMan Probe: 5’-6FAM-ATCATCGTCG TCAGAGCCACCGCBHQ1-3' **200нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
NEAT1	Sybr Green	F-5′-CTTCCTCCCTTTAACTTATCCAT TCAC-3′ (27) R-5′-CTCTTCCTCCACCATTACCAAC AATAC-3′ (27) **100нМ**	1. 50^0C- 2 мин 95^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-20c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
MALAT1	Sybr Green	F-5’- GCAGTATTGCATGTTAGG-3’ (18) R-5’- CCTCTGAGTGAAGTGTACTAT C-3’ (22) **500нМ**	1. 95^0C- 10 мин **45 циклов:** 2. 94^0C-10c 65^0C-20c (с температурным инкрементом до 55^0C) 72^0C-30c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов

Таблица S4. Продолжение

ROR	Sybr Green	F-5’-CTCAGTGGGGAAGACTCCAG-3’ (20) R-5’-AGGAAGCCTGAGAGTTGGC-3’ (19) **200нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-15c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
Gas5	Sybr Green	F-5’-TGAAGTCCTAAAGAGCAAGCC-3’ (21) R-5’-ACCAGGAGCAGAACCATTAAG-3’ (21) **200нМ**	1. 94^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-15c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
HOTAIR	Sybr Green	F-5’-GGCGGATGCAAGTTAATAAA AC-3’ (22) R-5’-TACGCCTGAGTGTTCACGGAG-3’ (21) **500нМ**	4. 95^0C- 10 мин **45 циклов:** 5. 94^0C-10c 65^0C-20c (с температурным инкрементом до 55^0C) 72^0C-30c 6. 55^0C- 15c Δt 50циклов
miR-21	Sybr Green TaqMan	F-5’-GCGGCAACACCAGTCGATG-3’ (19) R-5’-TGCGTGTCGTGGAGTC-3’ (16) **200нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 30 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-45c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
miR-27a	Sybr Green TaqMan	F-5’-ACACTCCAGCTGGGTTCACAGT GGCTAAG-3’(29) R-5’- AGTGCAGGGTCCGAGG (16) 6FAM- TTCAGTTGAGGCGGA ACT-BHQ2-3 **400нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 40 циклов:** 95^0C-15c 54^0C-45c 72^0C-35c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
miR-34a	Sybr Green	F- 5’-CGG TAT CAT TTG GCA GTG TCT-3’ (21) R- 5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’ (16) **200нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 35 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-60c 55^0C- 15c Δt 50циклов
miR-101	Sybr Green	F-5′- ACACTCCAGCTGGGTACAGT ACTGTGATA-3′ (29) R-5′-TGGTGTCGTGGAGTCG-3′ (16) **100нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-15c 51^0C-30c 72^0C-60c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов

Таблица S4. Продолжение

miR-107	Sybr Green	F-5’-ACACTCCAGCTGGGAGCAGCAT TGTACAGGG-3’ (31) R-5’-TGGTGTCGTGGAGTCGGCAATT CAGTTG-3’ (28) **250нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-15c 64^0C-40c 72^0C-20c 55^0C- 15c Δt 50циклов
miR-124	Sybr Green	F-5′-GCGGCCGTGTTCACAGCGGACC-3′(22) R-5′-GTGCAGGGTCCGAGGT-3′(16) **100нМ**	1. 50^0C- 2 мин 94^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 94^0C-15c 60^0C-30c 78^0C-20c 83^0C-11c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
miR-125b	Sybr Green	F-5’- GCGGCTCCCTGAGACCCTAAC-3’ (21) R-5’- GTGCAGGGTCCGAGGT-3’ (16) **700нМ**	1. 95^0C- 10 мин 2. **40 циклов:** 95^0C-15c 57^0C-45c 72^0C-25c 3. 55^0C- 15c Δt 35циклов
miR-181a	Sybr Green	F-5'-GCGGCAACATTCAACGCTGTC-3'(21) R-5’-GTGCAGGGTCCGAGGT-3’(16) **300нМ**	1. 95^0C- 10 мин **2. 45 циклов:** 95^0C-20c 63^0C-35c 3. 55^0C- 15c Δt 50циклов
β-actin	Sybr Green	F-5’-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3’(18) R-5’-TGGAAGGTGGACAGCGAGG-3’(19) **200нМ**	3. 95^0C- 5 мин **4. 45 циклов:** 95^0C-15c 60^0C-35c 72^0C-40c 5. 60^0C- 15c Δt 35циклов

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить искреннюю благодарность и признательность моему блестящему педагогу и учителю к.б.н. Владимиру Федоровичу Михайлову, который помогал не только в подготовке материалов для данной научной работы, но и в становлении моей научной деятельности. В мои достижения вложен его бесценный труд.

Моя работа была бы неполной и неоконченной, если бы не помощь и поддержка моего научного руководителя д.м.н., профессора Галины Дмитриевны Засухиной, которая дала мне новый дополнительный импульс и наделила энергией эту работу. Выражаю благодарность за огромный вклад и идейное вдохновление, которое она внесла в создание данной работы.

Искренняя благодарность и глубокая признательность заведующему лаборатории фармакологии противолучевых средств д.б.н. Льву Михайловичу Рождественскому за наставления, выдержку, терпение и ценные советы.

Хочу поблагодарить коллектив лаборатории молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов, а также сотрудников лаборатории фармакологии противолучевых средств за их участие в сборе и подготовке материалов для исследований, а также за моральную поддержку.

Особую благодарность выражаю д.б.н., профессору Андреяну Николавевичу Осипову и к.б.н. Денису Владимировичу Гурьеву за консультативную и методическую помощь в работе.

Отдельная благодарность моим родителям и друзьям за невероятную поддержку, понимание и веру в меня.