

*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***

Специальность

1.5.1 – радиобиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико- биологического агентства

**Научный руководитель** **Засухина Галина Дмитриевна**, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Группы мутагенеза и репарации Института Общей Генетики им.Н.И.Вавилова Российской Академии Наук

**Научный консультант** **Михайлов Владимир Федорович**, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна» ФМБА России

**Официальные оппоненты** **Воронина Екатерина Сергеевна**, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией мутагенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова»

**Гераськин Станислав Алексеевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией радиобиологии и экотоксикологии «Всероссийского научно-исследовательского института радиологии и агроэкологии»

**Ведущая организация** Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение "Российский Научный Центр Рентгенорадиологии" Министерства Здравоохранения Российской Федерации

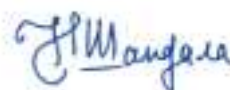
Защита диссертации состоится «21» октября 2021 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 462.001.04 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна» по адресу: 123182, г.Москва, ул. Живописная, 46.

Тел.: +7 (495) 190-96-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна» и на сайте организации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук



Шандала Н.К.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования 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. Однако при изучении воздействия радиации на клетки одни исследователи акцентировали внимание на экспрессии генов или микроРНК, в то время как другие – на днРНК (Li Z., 2018; Chen Y., 2021; Tang L., 2018; Schmitt A.M., 2016).

Динамика уровней активности генных структур при облучении разными дозами радиации могут служить ранними показателями опухолеобразования, прогностическими признаками течения патологического процесса, развития радиочувствительности (Михайлов В.Ф., 2019; Schmitt A.M., 2016).

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 различных линий животных (мышь линии BALB/c, C57Bl/6 и др.) и их органов к различным видам облучения, применение неодинаковых методов для оценки ответа клеток разных органов на действие радиации в зависимости от стадии опухолеобразования и ряда других факторов (Premkumar K., 2019).

В последние годы особое внимание уделяется использованию малых доз радиации (МДР) в терапии разных патологий человека, начиная от воспалительных процессов до опухолеобразования. Эта концепция определяется тем фактом, 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 (Кузин А.М., 1981). 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 прогностические маркеры патологического процесса, так и мишенью для специфической терапии (Feng H., 2019; Shin E., 2020).

В связи с вышеизложенным необходимым является изучение комплекса генетических структур (генов и 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 активируют структуры, контролирующие клеточный гомеостаз к стрессовым воздействиям, являющихся источником различных патологий человека, в частности, опухолеобразования.

Поэтому **целью** данного исследования было изучение комплекса генетических структур (генов и их регуляторов - некодирующих РНК, в частности днРНК и микроРНК), функции которых могут иметь существенное значение в ответе клетки на облучение, 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, 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, которые выражались 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), различающиеся в нормальных и опухолевых 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 С57В1/6 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 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 ВДР (горметизис). 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 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**

Основные положения диссертационной работы доложены на Научной конференции «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений» (Дубна, 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.), 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, 2020 г.).

### **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, подтверждающихся в ходе статистического анализа полученных данных с заданной вероятностью, и кроме того, с помощью сравнения с данными, представленными другими исследователями.

Диссертация апробирована на заседании секции Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна (протокол №1 от 10 марта 2021г.).

### **Личный вклад автора**

Автором проанализирована научная литература по исследуемой проблеме, проведены экспериментальные исследования, анализ и статистическая обработка полученных результатов, подготовлены материалы публикаций по теме диссертации.

### **Публикации**

По результатам диссертации опубликовано 12 статей в российских изданиях, рекомендованных ВАК, 1 статья в международной базе цитирования Scopus, а также 8 тезисов докладов в материалах отечественных и международных конференций и 1 стандарт организации.

### **Структура диссертации**

Диссертация изложена на 127 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, а также списка литературы и приложения. Работа содержит 7 таблиц, 31 рисунок. Список литературы включает 206 источников, из них 21 отечественных и 185 зарубежных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный следующим вопросам: 1) Различия в чувствительности нормальных и злокачественных клеток к действию малой и высокой дозы радиации по критерию активности генов и некодирующих РНК; 2) изменение активности генов и их регуляторов в ответ на действие радиации; 3) некодирующие РНК как возможные показатели прогноза онкозаболеваний и мишени для терапии.

Из анализа литературы следует, что до сих пор действие малых доз радиации на клетки человека вызывает немало противоречий. В то же время актуальность их применения растет в связи с лечением не только воспалительных процессов, вирусных инфекций (COVID-19), а также для лечения онкологических заболеваний. Изучение данного вопроса особенно важно на фоне повсеместного использования рентгеновских процедур, во время которых происходит облучение в малых дозах (до 100 мГр).

### **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **1. Объекты исследований**

##### **1.1. Биоптаты опухолей человека**

Объектом исследования служили биоптаты опухолей и нормальных тканей, окружающих опухоль (незадействованных в патологический процесс) от 35 пациентов, в возрасте от 30 до 74 лет, которым был поставлен диагноз плоскоклеточный рак гортани (ПРГ) с классификацией от T1N0M0 до T4N1M0.

##### **1.2. Контрольная группа пациентов**

В качестве контрольной группы для пациентов с ПРГ использовали биоптат нормальных клеток плоского эпителия гортани, не задействованный в патологический процесс и взятый у этих же пациентов.

При исследовании крови в качестве контрольной группы исследовали здоровых доноров в количестве 27 человек (по данным Центра переливания крови Минздравсоцразвития России) и 5 человек с сопутствующим заболеванием неонкологической природы (парез, стеноз гортани).

### **1.3. Клеточные культуры**

Объектом исследования являлись лимфоциты цельной крови здоровых доноров и клеточная линия Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия) (ФМБА им. А.И.Бурназяна). Часть исследования проводилась на культуре клеток легочной карциномы Льюиса мышей (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина).

### **1.4. Лабораторные животные**

В работе использовали 40 мышей в возрасте 4х недель линии C57Bl/6 и 183 самца 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 распорядительному документу EEC Directive 2010/63/EU.

## **2. Методы исследования**

### **2.1. Культура клеточной линии Jurkat и лимфоцитов человека**

#### **2.1.1. Выделение и условия культивирования лимфоцитов крови человека.**

Лимфоциты выделяли из цельной крови здоровых доноров обоего пола не позднее чем через 24 ч от момента взятия крови в вакутейнеры с ЭДТА при помощи стандартной процедуры разделения на Ficoll-Paque с плотностью 1,077 г/мл. Конечная концентрация клеток составляла около  $1 \times 10^6$  клеток/мл.

#### **2.1.2. 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 0,1 Гр, 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 генов и некодирующих РНК.

### **2.2. Культура легочной карциномы мышей**

#### **2.2.1. Получение опухолевой суспензии карциномы легких Льюиса и трансплантация мышам.**

Для получения опухолевой суспензии извлекали опухоль у мыши – донора. Делали навеску опухоли (4г) добавляли р-р Хенкса (24мл). Полученный раствор в объеме 0,2 мл вводили мышам линии C57Bl/6 ( $10^5$  клеток в 0,2 мл р-р Хенкса/ животное). Клетки опухолевой ткани вводили подкожно с помощью шприца в правую заднюю лапу мышам линии C57Bl/6 (самки).

#### **2.2.2. Облучение мышей в малой дозе (75 мГр).**

Тотальное рентгеновское облучение в дозе 75 мГр производили на аппарате РУСТ М1 на 10-е сутки после трансплантации. 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. 1.

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.



**Рис. 1.** Схема опыта на мышах с перевитой карциномой Льюиса и облучением в малой дозе

### 2.2.5. Пролонгированное облучение мышей.

В эксперименте использовали самцов мышей-гибридов (СВА × С57В1) F1, массой 20–24 г. Всего исследовалось 183 мыши (89 и 94 на 8 и 10 месяцев, соответственно). Низкомощностное пролонгированное облучение мышей проводили в общей дозе 12,6 Гр на цезиевой гамма-установке Панорама-3С (10 мГр/мин) в течение 21 часа. 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 месяцев после облучения, соответственно.

### 2.2.6. Получение биологического материала мышей.

Мышей линии С57В1/6 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  $0,5-2 \times 10^6$  клеток. Мышей линии (СВА × С57В1) F1 подвергали эвтаназии методом дислокации шейных позвонков, после чего извлекали костный мозг из бедренных костей, как указано выше.

## 2.3. Получение гомогената органов и тканей

Образцы органов мышей и навески биоптатов опухолей и нормальных тканей пациентов с ПРГ одинаковой массы (0,05г) обрабатывали на автоматическом гомогенизаторе Daihan HS (DAIHAN Scientific, Ю. Корея) в растворе охлажденного тризола или фосфатного буфера (1 мл) при скорости вращения насадки 5000 об/мин.

### 2.4. Выделение общей РНК, содержащей фракцию зрелых микроРНК

Выделение тотальной РНК проводили тризольным методом с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

### 2.5. Обратная транскрипция для мРНК генов и днРНК человека и мышей

Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с помощью набора лиофилизированных реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) «GenePak RT Core» («Promega», США).

### 2.6. Обратная транскрипция для зрелых микроРНК человека и мышей со шпилькообразными праймерами «stem-loop»

Суммарная РНК, выделенная методом «Trizol RNA Prep 100», содержала фракцию зрелых микроРНК размером 20-25 п.н. Нами был применен метод, основанный на присоединении специфического шпилькообразного («stem-loop») праймера со свободным 3'- концом к зрелой микроРНК за счет комплементарного взаимодействия с небольшими



участками микроРНК (Chen C., 2005). На стадии ОТ обратная транскриптаза использовала этот праймер как затравку и синтезировала кДНК по матрице микроРНК с получением конструкции длиной около 70 нуклеотидов, которая в дальнейшем могла использоваться в ПЦР в реальном времени.

## **2.7. ПЦР в реальном времени**

ПЦР в реальном времени генов, днРНК и микроРНК у животных и человека проводили на амплификаторе ДТ-прайм («НПО ДНК-технология», Россия) с использованием интеркалирующего красителя SybrGreen I (Thermo Scientific, США) или линейных зондов TaqMan Probe (ООО «ДНК-синтез», Россия). Условия ПЦР в реальном времени для генов и микроРНК были подобраны эмпирическим путем с помощью температурного градиента по матрице. Регистрация сигнала флуоресценции происходила на канале FAM при возбуждении флуорофора 490 нм и испускания 530 нм.

## **2.8. Анализ данных, полученных с помощью ПЦР в реальном времени, и статистическая обработка результатов**

Данные анализировали с использованием метода  $\Delta\Delta C_t$  (Livak K. J., (2001).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ STATISTICA 7.0 и включала в себя определение медианы и 25% и 75% квартилей. (Software.informer, STATISTICA 7.0. // 2017). Каждая ПЦР проводилась не менее двух раз, для оценки значимости различий применяли критерий Стьюдента и непараметрические критерии Манна-Уитни и Фишера. В присутствии нулевого варианта использовали тест Шеллинга-Вольфайля. Значения медианы в контрольной группе были приняты за 1, а значения медианы в исследуемых группах показывали во сколько раз уровень экспрессии исследуемого показателя выше или ниже по отношению к контрольной группе. Корреляционные зависимости рассчитывали по непараметрическому ранговому критерию Спирмена. Данные считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Изучение генов, регулируемых некодирующими РНК, при развитии плоскоклеточного рака гортани, как возможных показателей прогноза заболеваний**

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

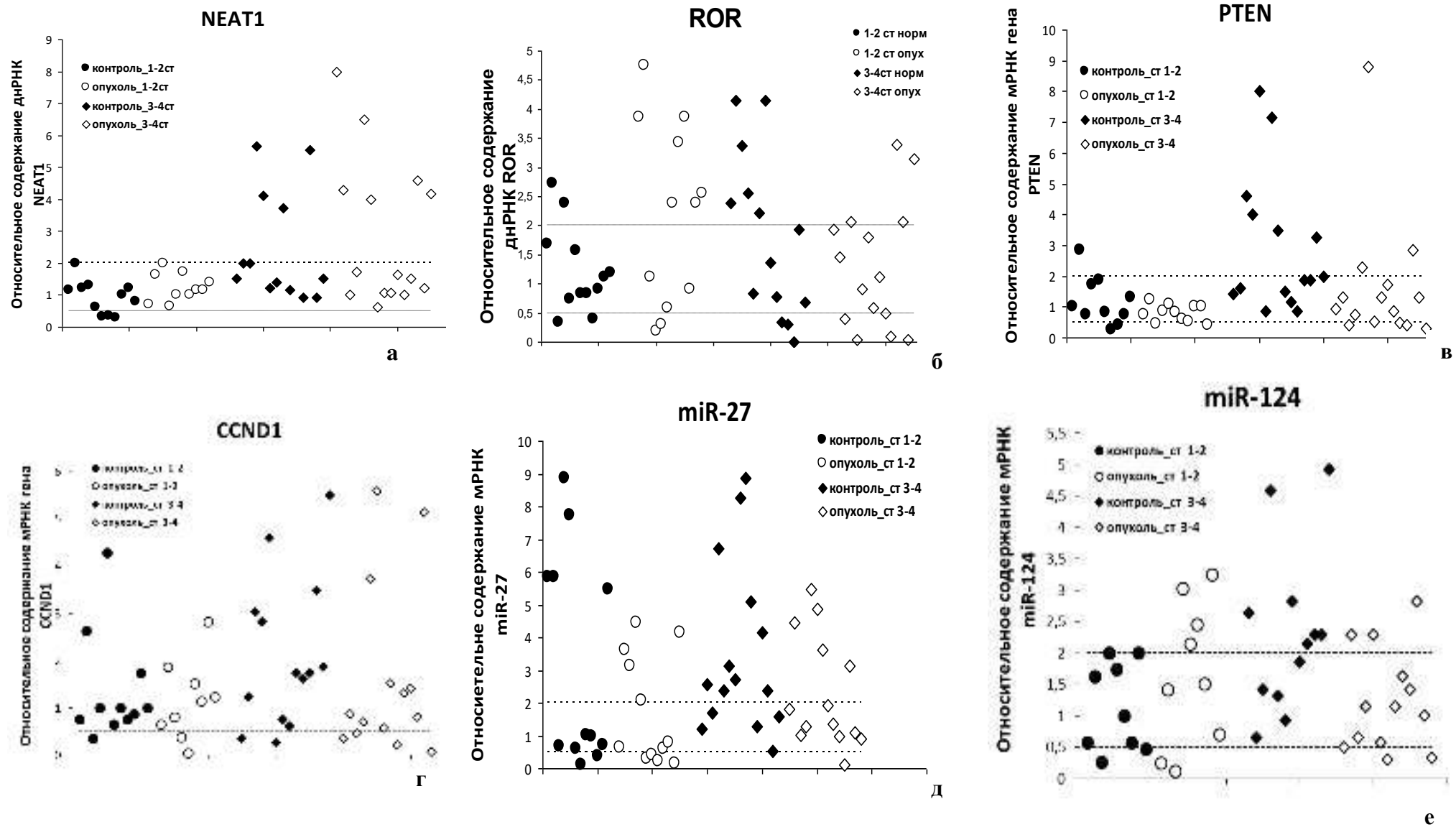
Задачей исследования явилось определение вовлеченности различных показателей в процессы злокачественной трансформации карциномы гортани, поскольку эпигенетические изменения являются необходимым звеном при онкотрансформации и, в отличие от структурных повреждений генома, поддаются коррекции. Из изменяющихся сотен микроРНК и днРНК в данном исследовании нами проверена возможность использования наиболее перспективных из них (Barbato C., 2014; Folini M., 2010, Hunt S., 2014; Tian Y., 2014). Результаты, полученные при обследовании всех 35 пациентов вне зависимости от пола, стадии заболевания и возраста до лечения представлены в табл. 1. Показано, что в биоптатах опухоли происходило подавление активности гена *PTEN* и *miR-27a* в 1,75 и 1,88 раз, соответственно. Кроме того, в озлокачествленных тканях пациентов отмечалось повышение экспрессии *miR-21* в 7,5 раз по сравнению с контролем. В крови пациентов зафиксировано повышение активности некоторых исследуемых показателей (увеличение экспрессии гена *CCND1* в 24,3 раза, и *miR-21* – в 73,7 раз).

Таблица 1 - Содержание мРНК генов, микроРНК и днРНК в опухолевой, нормальной ткани и крови пациентов с ПРГ

Показатель	Биоптат ткани		Периферическая кровь	
	Опухоль	Контроль (окружающая опухоль ткань)	Пациенты	Доноры
мРНКгена <i>P53</i>	0,78 [0,43-1,03]	1,0 [0,46-1,32]	-	-
мРНКгена <i>CCND1</i>	0,812 [0,47-1,32]	1,0 [0,55-1,87]	<b>24,3*</b> [11,3-34,3]	1,0 [0,5-2,83]
мРНКгена <i>ORA0V1</i>	0,8 [0,004-2,46]	1,0 [0,2-3,2]	-	-
мРНКгена <i>PTEN</i>	<b>0,57*</b> [0,32-0,93]	1,0 [0,53-2,0]	2,55* [2,0-3,03]	1,0 [0,57-2,0]
днРНК <i>NEAT1</i>	1,23 [0,81-2,46]	1,0 [0,75-1,62]	<b>1,7*</b> [1,6-2,64]	1,0 [0,4-1,86]
днРНК <i>MALAT1</i>	1,23 [0,75-2,14]	1,0 [0,49-1,57]	<b>2,0*</b> [1,31-2,63]	1,0 [0,46-2,0]
днРНК <i>ROR</i>	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 <i>miR-21</i>	<b>7,5*</b> [5,2-13]	1,0 [0,57-2,1]	<b>73,73*</b> [21,11-137,18]	1,0 [0,21-3,06]
микроРНК <i>miR-27a</i>	<b>0,53*</b> [0,25-1,3]	1,0 [0,5-2,4]	<b>3,48*</b> [1,07-8,57]	1,0 [0,01-2,47]
микроРНК <i>miR-34a</i>	0,96 [0,21-1,19]	1,0 [0,25-3,68]	-	-
микроРНК <i>miR-101</i>	0,93 [0,5-1,9]	1,0 [0,4-1,9]	-	-
микроРНК <i>miR-124</i>	0,81 [0,35-1,31]	1,0 [0,5-1,31]	<b>0,015*</b> [0,005-0,27]	1,0 [0,07-2,73]
микроРНК <i>miR-125b</i>	1,52 [0,06-0,6]	1,0 [0,59-6,59]	-	-
микроРНК <i>miR-181a</i>	-	-	1,31 [0,3-3,4]	1,0 [0,4-3,03]
<p><i>Примечание. * - отличия с показателями группы «Контроль» и «Доноры» статистически значимы (p &lt; 0,05). Медиана групп контроля («окружающая опухоль ткань», или «доноры» для крови) принята за единицу</i></p>				

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

Различия, наблюдаемые в уровнях экспрессии микроРНК и днРНК у пациентов, диктуют важность индивидуального определения этих показателей для выбора терапевтической цели. На рис. 2 представлены индивидуальные данные по изучению показателей экспрессии между 1-2 и 3-4 стадиями ПРГ анализ и коррекция которых могут быть использованы для применения в персонифицированной терапии. Оценка индивидуальной экспрессии днРНК NEAT1 и ROR показала, что их содержание существенно увеличивается у пациентов с 3-4 стадией ПРГ (рис. 2 а, б). Кроме того, в опухолях с более агрессивными стадиями заболевания (3 и 4) было обнаружено снижение экспрессия гена *PTEN*, что является хорошим прогностическим маркером для оценки ответа на радиотерапию (рис. 2 в). Также показано, что в биоптатах у пациентов с 3-4 стадиями заболевания, уровень *CCND1* существенно выше по сравнению с группой контроля (рис. 2 г). Определение избыточной экспрессии *CCND1* поможет идентифицировать пациентов с неблагоприятным прогнозом и использовать этот показатель как прогностический. Индивидуальные различия в экспрессии miR-27a показывают, что данная микроРНК значима при развитии ПРГ (рис. 2 д). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженных индивидуальных различиях по уровням экспрессии микро- и длинных некодирующих РНК, что имеет огромное значение как для диагностико-прогностических заключений, так и подходов к индивидуальной терапии.

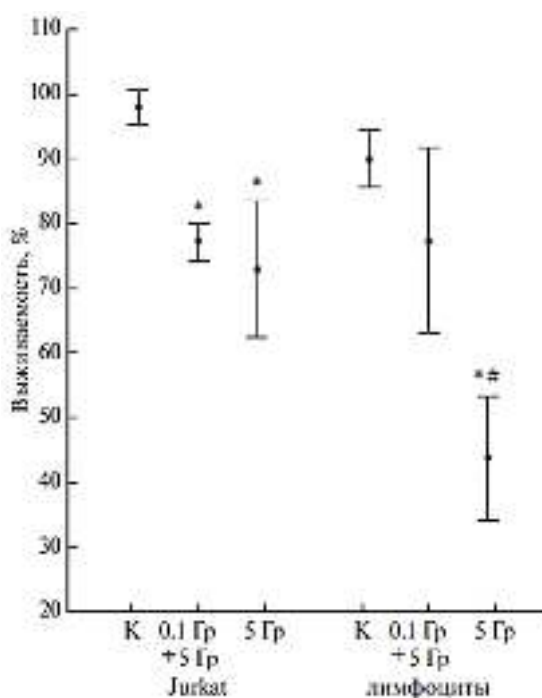


**Рис. 2.** Индивидуальные значения относительного содержания NEAT1 (а), ROR (б), *PTEN* (в), *CCND1* (г), miR-27а (д), miR-124 (е) в опухолях и нормальном эпителии пациентов 1-2 и 3-4 стадии ПРГ

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

Нами проведено сравнение влияния действия МДР на выживаемость клеток, а также функциональную активность генов *P53*, *NFkB* и их мишеней в нормальных лимфоцитах и клетках Т-лимфобластного лейкоза человека (линия Jurkat) при развитии адаптивного ответа (АО).

На рис.3 представлены результаты выживаемости лимфоцитов и клеток линии Jurkat (%). Для лимфоцитов наблюдали различия в выживаемости через 20 часов после облучения в дозе 5 Гр (42%) по сравнению с группой, которая включала предварительное облучение в малой дозе 0,1 Гр и последующее воздействие в дозе 5 Гр (76%). Для клеток линии Jurkat воздействие в дозе 0,1 Гр не приводило к увеличению их радиорезистентности по отношению к группе с облучением в дозе 5 Гр (76% и 72%, соответственно). Таким образом, в проведенном эксперименте наблюдали формирование АО в лимфоцитах здоровых доноров, а в клетках линии Jurkat с мутантным геном *P53* – нет.



**Рис. 3.** Выживаемость лимфоцитов и клеток линии Jurkat в контроле (К), через 20ч после однократного воздействия радиации в дозе 5 Гр, а также комбинированного облучения в дозах 0,1 Гр и через 4 ч 5 Гр (0,1 Гр+5 Гр)  
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+5 Гр) и 5 Гр ( $p < 0,05$ ).

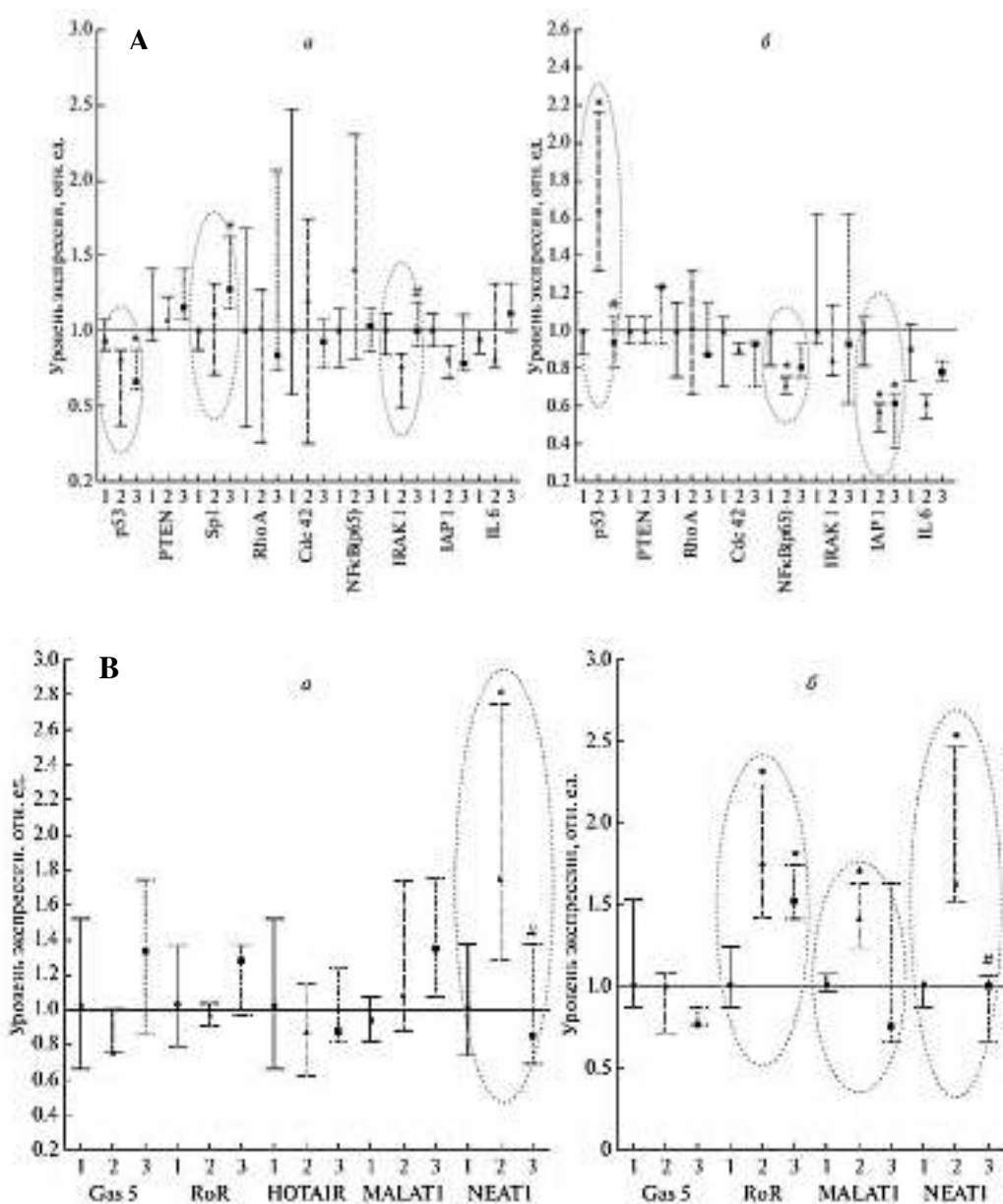
Результаты определения содержания мРНК генов и некодирующих РНК в лимфоцитах и клетках Jurkat в группах 5 Гр и (0,1 Гр + 5 Гр) через 20 часов после облучения представлены на рис.4. Данные представлены в виде медианы и квартилей. Значения медианы в контрольных группах приняты за 1.

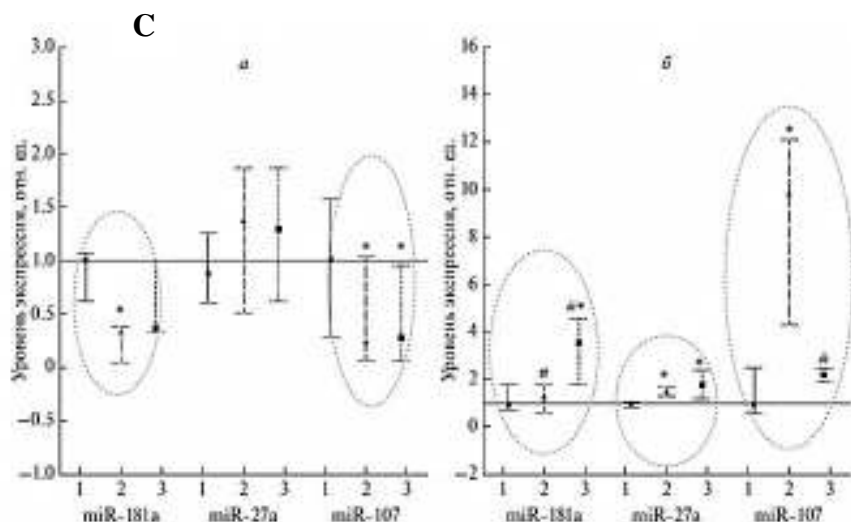
Проведенное нами исследование показало, что в лимфоцитах наличие АО сопровождалось следующими событиями. Во-первых, активацией экспрессии *P53* через 1 час после действия МДР, которая проявляется в увеличении мРНК гена *P53*

и снижении содержания зрелых miR-27a и miR-181a, имеющих в качестве мишени мРНК гена *P53*, а также увеличением содержания днРНК Gas5, выполняющей функцию поддержания активности *P53*.

Во-вторых, снижением активности системы NFκB через 1 час после действия МДР, которая проявляется в снижении уровня мРНК генов - мишеней ТФ NFκB, а именно мРНК генов *RhoA*, *cdc42* и *IL6* и увеличении содержания днРНК Gas5. Снижение содержания мРНК гена *NFκB(p65)* сохраняется и через 20 часов после облучения в дозе 5 Гр. В клетках линии Jurkat, не проявляющих АО после воздействия малой дозы 0,1 Гр, на иницирующей стадии АО не возникало активации системы P53. Наоборот, наблюдалось увеличение содержания мРНК гена *NFκB(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.

Таким образом, нами показано, что в нормальных лимфоцитах формировался АО, в то время как в клетках линии Jurkat этот эффект не наблюдался.



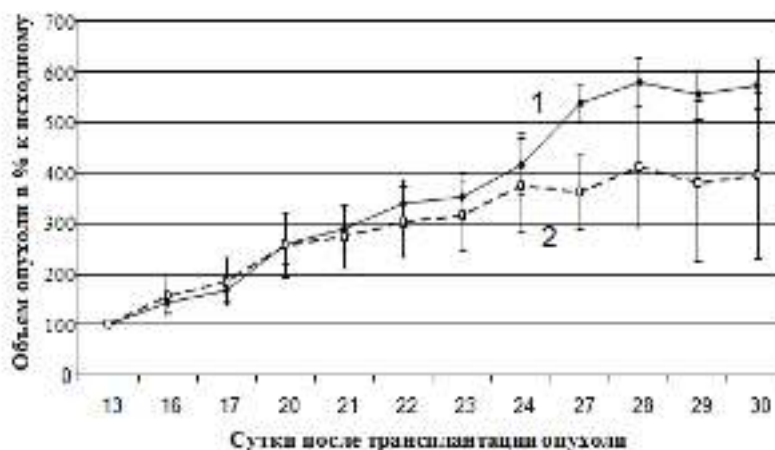


**Рис. 4.** Изменение содержания генов (А), днРНК (В) и микроРНК (С) в клетках линии Jurkat (а) и нормальных лимфоцитах (б) в контроле (1) и через 20 ч после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия 0,1 Гр, а затем (через 4 часа) 5 Гр (3).

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

Исследуемым мышам линии С57В1/6 в заднюю правую лапу была подкожно диспергирована опухолевая ткань, а затем на 10, 13, 17 и 21 сутки осуществляли облучение в дозе 75 мГр.

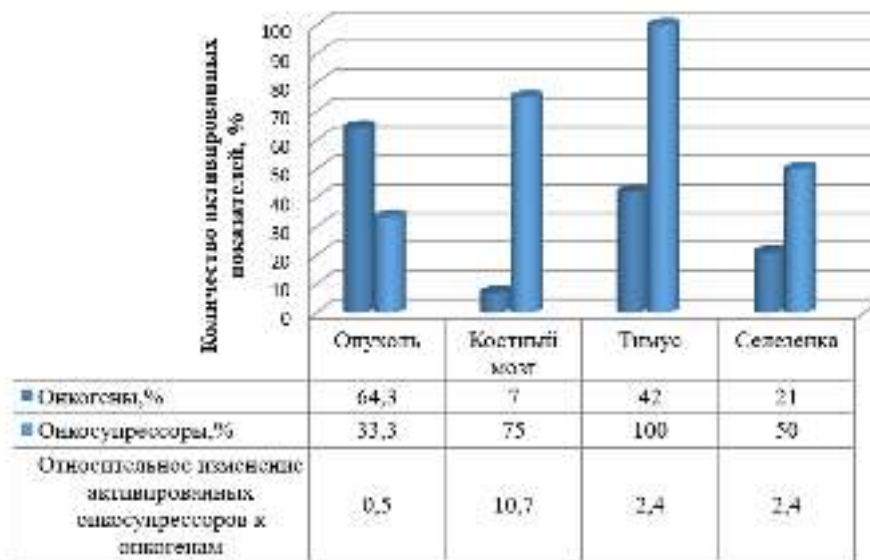
Наблюдение за двумя группами мышей (облученными в малой дозе и без облучения), в течение 30 суток показало, что рост опухоли до 20-х суток в обеих группах происходит абсолютно одинаково, а затем начинается постепенное замедление роста в группе облученных мышей, переходящее после 28 суток на плато у обеих групп, но с выраженной тенденцией на сниженном уровне в группе с облучением в МДР (рис. 5).



**Рис. 5.** Динамика роста карциномы Льюиса (% к исходному объему на 13-е сутки, когда измерение становится возможным) группах необлученных (1) и облученных в МДР (2) мышей

Исследованные нами молекулярно-генетические показатели в данном эксперименте были разделены на активирующие (онкогены) и подавляющие (онкосупрессоры) рост опухоли.

Показано, что в опухолевых клетках количество активированных онкосупрессоров составляло 33,3% (активируется 2 из 6 исследуемых онкосупрессоров), а процент активированных онкогенов - 64,3% (9 из 14 показателей). В костном мозге отмечается 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. 6).



**Рис. 6.** Процент активированных онкогенов и онкосупрессоров в различных органах мышей в ответ на облучение в малой дозе

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 (Михайлов В.Ф., 2019, 2020).

#### **4. Оценка активности генов и некодирующих РНК в процессе опухолеобразования при пролонгированном облучении мышей**

Результаты экспериментов на облученных мышах-гибридах линии (СВА × С57В1) F1 показали, что в отдаленные сроки после лучевого поражения (на 8 и 10 месяц) нарушается функционирование системы поддержания стабильности генома, выявляемое при исследовании транскрипционной активности генов *P53*, *NFkB* и их генов-мишеней: *G-SCF* и *iNOS*, а также днРНК и микроРНК: *NEAT1*, *miR-21*, *miR-125b*.

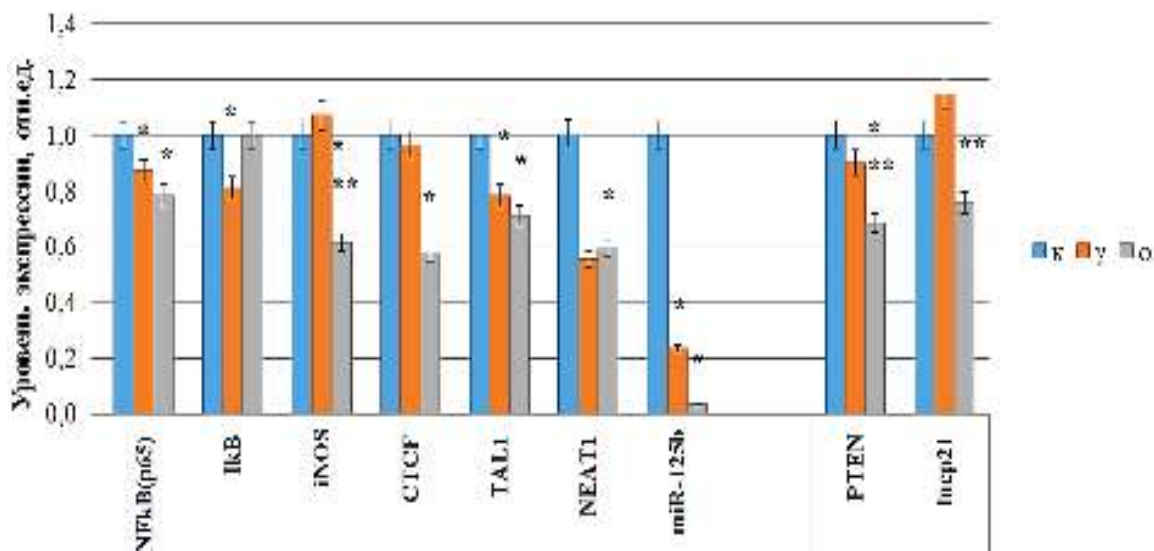
Кроме того, к 10 месяцу после облучения у 14 из 94 мышей гистологически были обнаружены лимфомы в печени, брюшной полости и подкожно.

К 8 месяцу после облучения 46% онкогенов (6 из 13) проявили свою активность в ответ на действие ионизирующего излучения (*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» подавлялись все онкосупрессоры (100%) и 86 % онкогенов. Таким образом, к 8 месяцу после



облучения преобладало число активированных онкогенов, что, вероятнее всего, привело к выходу опухолей на 10 месяц.

На рис. 7 представлены только статистически значимые данные по активности генов и их регуляторов на 10 месяц после облучения мышей с опухолями и без них среди группы всех исследованных генетических структур.



**Рис. 7.** Содержание мРНК онкогенов и онкосупрессоров (медиана), имеющих статистически значимые различия 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 статистические 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

Анализ представленных результатов позволяет сделать предварительный 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 и служить биомаркерами это процесса.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлены статистически значимые различия в чувствительности нормальных и злокачественных клеток человека *in vitro* к радиации, при 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 (СВА×С57В1) 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 (NFκB(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 РАБОТЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, рекомендованных SCOPUS

**Saleeva D.V.** Changes in the Activity of Genes Involved in the Regulation of Hematopoiesis during Tumorigenesis in Irradiated Mice / **Saleeva D.V.**, Mikhailov V.F., Rozhdestvenskii L.M., Shulenina L.V., Raeva N.F., Zasukhina G.D. // Doklady Biological Sciences. 2020, V. 491, pp. 57–59.

### Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Шуленина Л.В. МикроРНК в крови пациентов с раком предстательной железы как возможный показатель ранних осложнений лучевой терапии / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. 57 (6): 598-607
2. Рождественский Л.М. Оценка влияния противолучевых средств при пролонгированном низкоэнергетическом излучении на экспрессию генов и микроРНК в костном мозге мышей в отдаленный период / Рождественский Л.М., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Салеева Д.В. // Радиационная биология. Радиобиология. Радиоэкология. 2018. Т.58. №6: 608-618
3. Салеева Д.В. Функционирование регуляторных РНК, влияющих на развитие опухолевых клеток у больных раком гортани / Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Бахтин А.А., Акопян К.В., Виноградов В.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия - 2018; 62(4).
4. Михайлов В.Ф. Некоторые аспекты канцерогенеза, связанные с генетическими и эпигенетическими факторами / Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Васильева И.М., Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // Успехи современной биологии, 2018, том 138, № 5, с. 3–21.
5. Шуленина Л.В. Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Вестник ВГУ, серия: химия. биология. фармация. – 2019. 1: 103-111.

6. Михайлов В.Ф. Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека / Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Васильева И.М., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // Цитология. 2019. 61, № 6, с. 427–438.
7. Mikhailov V.F. The effect of low doses of ionizing radiation on the expression of genes and non-coding RNA in normal and malignant human cells / Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Raeva N.F., Vasilieva I.M., Saleeva D.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D. // Cell and Tissue Biology. 2019.V.13, Pp. 423–433(2019).
8. Шуленина Л.В. Сравнительный анализ длинных некодирующих рнк NEAT1, MALAT1, GAS5, ROR, HOTAIR в крови больных раком простаты до и после лучевой терапии / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Незнанова М.В., Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // Саратовский научно-медицинский журнал 2019; 15 (4): 1004–1008.
9. Салеева Д.В. Анализ изменения активности генов, контролирующих регуляцию гемопоэза при формировании опухолей у облученных мышей / Салеева Д.В., Михайлов В.Ф., Рождественский Л.М., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д. // Доклады академии наук. Науки о жизни. 2020. 491: 168-171
10. Шуленина Л.В. Необходимость стандартизации и валидации метода ПЦР в реальном времени для определения зрелой miR-21 в крови пациентов / Шуленина Л.В., Салеева Д.В. // Медицинская генетика. 2020; 19(12): 66-67.
11. Михайлов В.Ф. Активность генов и некодирующих РНК как подход к определению ранних биомаркеров радиоиндуцированного опухолеобразования у мышей / Михайлов В.Ф., Салеева Д.В., Рождественский Л.М., Шуленина Л.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д. // Генетика. 2021; 11 – принята к печати.
12. Салеева Д.В. Перспективы применения малых доз радиации в комплексной терапии COVID-19 / Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // Вопросы Вирусологии. 2021; 66 - принята к печати.

#### Статьи в сборниках, и тезисы конференций

1. Shulenina L.V. Content of miRNAs and mRNAs of genes in peripheral blood patients with prostate cancer during formation. Complications of the pelvic organs after radiation therapy / Shulenina L.V., Mikhailov V.F., Raeva N.F., Zasukhina G.D., Neznanova M.V., Saleeva D.V. // Materials of current problems of radiobiology and astrobiology. Genetic and epigenetic effects of ionizing radiation, Dubna, Russia -2016. P. 76-77.
2. Saleeva D.V. Study of gene expression affecting cell proliferation and genome stability in patients with cancer / Saleeva D.V., Mikhailov V.F., Shulenina L.V. // XII International Pirogov scientific medical conference for students and young scientists, Moscow, Russia – March, 2017, Abstract, oral report – p. 59.
3. Шуленина Л.В. Экспрессия некодирующих РНК – новый подход для диагностики, прогноза, профилактики и лечения патологий человека / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М., Засухина Г.Д., Салеева Д.В. // БЕЛЯЕВСКИЕ ЧТЕНИЯ. Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева. 7–10 августа 2017 г., Новосибирск, Россия, 2017. Стр.159.
4. Шуленина Л.В. Некодирующие РНК как показатели ответа генов на воздействие ионизирующей радиации у человека (научный доклад) / Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М., Салеева Д.В., Засухина Г.Д. // 23 съезд физиологического общества им.Н.И.Павлова, 2017г., Воронеж
5. Saleeva D.V. Study of the significant long-noncoding RNA and structural genes in patients with squamosal cell carcinoma / Saleeva D.V., Mikhailov V.F., Shulenina L.V. // XIII International Pirogov scientific medical conference for students and young scientists, Moscow, Russia – March, 2018, Abstract, poster – p. 243.
6. Шуленина Л.В. Регуляторная роль некодирующих РНК в экспрессии генов при формировании радиоответа в нормальных и опухолевых клетках человека /

- Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., **Салеева Д.В.**, Раева Н.Ф., Ткачева А.Ф., Засухина Г.Д. // Радиобиологические основы лучевой терапии. Зая Российская конференция с международным участием. Дубна, Россия - 2019. 167-169.
7. Шуленина Л. В. Влияние малых доз радиации на регулирование p53- и NFkB-систем клеточного гомеостаза некодирующими РНК в лимфоцитах и Е-лимфобластоидных клетках человека / Шуленина Л. В., Раева Н.Ф., **Салеева Д. В.**, Незнанова М. В., Михайлов В. Ф., Засухина Г. Д. // VII съезд вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. Сборник тезисов Международного Конгресса. 2019. 523.
8. **Салеева Д.В.** Роль активности генов и некодирующих РНК при облучении малыми дозами радиации в нормальных и онкотрансформированных клетках мышей / **Салеева Д.В.**, Шуленина Л.В., Н.Ф.Раева, Н.И.Лисина, К.Ю.Романова, Г.Д.Засухина // Школы-конференции молодых ученых и специалистов "Ильинские чтения 2020" (Москва, 22–24 декабря 2020 г.).

### Список сокращений

АО - адаптивный ответ  
ВДР – высокие дозы радиации  
днРНК – длинные некодирующие РНК  
кДНК - комплементарная ДНК  
МДР – малые дозы радиации  
ОТ - обратная транскрипция  
ПРГ - плоскоклеточный рак гортани