Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
проф., д-р биол. наук
_____В.Н. Стегний
«__11__» __июня__ 2021 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА МАГИСТРА

РОЛЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ADAMTS1 В ФОРМИРОВАНИИ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

по направлению подготовки 06.04.01 – Биология
Направленность (профиль) «Генетика»

Мурашкина Анастасия Александровна

Руководитель ВКР
д-р биол. наук
_____С.А. Васильев
подпись
«__11__» __июня__ 2021 г.

Автор работы
студент группы №011921
_____ А.А. Мурашкина
подпись

Томск–2021

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Наименование учебного структурного подразделения

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ООП
проф., д-р биол. наук
_____ В.Н. Стегний
подпись
«20» декабря 2019 г.

ЗАДАНИЕ

по выполнению выпускной квалификационной работы бакалавра / специалиста /магистра обучающемуся

Мурашкиной Анастасии Александровны
Фамилия Имя Отчество обучающегося

по направлению подготовки Код Наименование направления подготовки, направленность (профиль) «Наименование образовательной программы»

1 Тема выпускной квалификационной работы
Роль металлопротеиназы межклеточного матрикса ADAMTS1 в формировании индивидуальной радиочувствительности

2 Срок сдачи обучающимся выполненной выпускной квалификационной работы:
а) в учебный офис / деканат – июнь 2021 б) в ГЭК – июнь 2021

3 Исходные данные к работе:
Объект исследования – ответ клеток человека на воздействие ИИ
Предмет исследования – участие ADAMTS1 в ответе на ИИ
Цель исследования – изучить роль металлопротеиназы ADAMTS1 в формировании индивидуальной радиочувствительности
Задачи:
1. опред. влияние нокдауна гена ADAMTS1 на радиационно-индуцир. ответ
2. провести анализ влияния ~~снижения~~ ADAMTS1 на радиац.-индуцир. ответ
3. оценить влияние ADAMTS1 на экспрессионный профиль
Методы исследования:
FISH, ПЦР в реальном времени, оценка клоногенной выживаемости, полнотранскриптомный анализ с помощью микрочипов

Организация или отрасль, по тематике которой выполняется работа, –
НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

4 Краткое содержание работы

Руководитель выпускной квалификационной работы
НИ рук. лаб. цитогенетики НИИМГ ТНИМЦ _____ / Васильев С.А.
должность, место работы *подпись* *И.О. Фамилия*

Задание принял к исполнению
студент Б11 НИ ТГУ _____ / Мурашкина А.А.
должность, место работы *подпись* *И.О. Фамилия*

ОТДЕЛ КАДРОВ

АННОТАЦИЯ

Лучевая терапия наряду с химиотерапией и хирургическими методами является на сегодняшний день одним из основных подходов к лечению рака. Однако успешное применение данного метода осложняется по двум причинам: радиорезистентность клеток опухоли и повреждение клеток нормальной ткани, находящихся в области воздействия ионизирующего излучения. Эти ограничения требуют разработки способов либо радиосенсибилизации опухолевых клеток, либо защиты клеток нормальной ткани от воздействия ионизирующего излучения. Поскольку радиочувствительность — во многом генетически детерминированное качество клетки, ткани и организма в целом, выявление и всестороннее изучение генов, определяющих индивидуальную радиочувствительность человека, является одной из приоритетных задач в современной лучевой терапии онкологических заболеваний.

В основе индивидуальной радиочувствительности лежат процессы ответа на повреждение ДНК, а именно — процесс репарации, а также различные сигнальные пути. В последнее время всё большая роль в ответе на повреждение ДНК отводится сигнальным путям, включающим взаимодействие с межклеточным матриксом. В связи с этим, возможно, что сигнальные пути с участием компонентов межклеточного матрикса могут играть важную роль в механизмах ответа клеток на радиационно-индуцированное повреждение ДНК и вносить существенный вклад в формирование индивидуальной радиочувствительности человека. Выявление механизмов регуляции экспрессии генов, принимающих участие в ответе клеток на повреждение ДНК, позволит глубже понять реализацию такого ответа, расширить имеющиеся представления об отдельных сигнальных путях и, потенциально, связать между собой различные пути регуляции репарации ДНК.

Ранее в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (г.Томск) были проведены исследования, выявившие гены, дифференциальная экспрессия которых оказалась связана с эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК. Ген *ADAMTS1* был выбран для последующего изучения. Продуктом гена *ADAMTS1* (дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1) является эндопептидаза межклеточного матрикса, что, на основе вышесказанного, позволяет сделать предположения о его возможной роли в формировании радиационно-индуцированного ответа клеток.

Объект исследования — ответ клеток человека на воздействие ионизирующего излучения.

Предмет исследования — участие металлапротеиназы межклеточного матрикса ADAMTS1 в ответе клеток на радиационное воздействие.

Цель диссертационной работы — изучение роли металлопротеиназы межклеточного матрикса ADAMTS1 в формировании индивидуальной радиочувствительности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить влияние нокаута гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ в клетках посредством оценки клональной выживаемости и частоты микроядер.
2. Провести анализ влияния сверхэкспрессии гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ в клетках посредством оценки частоты микроядер.
3. Оценить влияние *ADAMTS1* на экспрессионный профиль в клеточной линии HeLa.

Результаты:

1. Нокаут гена *ADAMTS1* приводит к снижению клональной выживаемости в 1,9 раза ($p = 0,014$) после воздействия ионизирующего излучения в дозе 2 Гр и к повышению частоты микроядер относительно исходной линии HeLa: в 1,6 раза ($p = 0,001$) до облучения и в 1,9 раза — после ($p = 0,061$).
2. При воздействии ионизирующим излучением в дозе 2 Гр сверхэкспрессия *ADAMTS1* в клеточной линии HeLa с нокаутом *ADAMTS1* снижала частоту микроядер с 55,3 ± 8,3 до 28,7 ± 10,3‰ ($p < 0,05$), что не отличается статистически значимо от исходной клеточной линии HeLa (36,0 ± 7,2‰). До облучения частота микроядер в клеточных линиях после трансфекции не отличалась от таковой в контрольных клеточных линиях.
3. В клеточной линии, нокаутной по гену *ADAMTS1*, экспрессия 57 генов изменялась по сравнению с исходной линией HeLa до облучения, после облучения изменялась экспрессия 103 генов. Гены, дифференциально экспрессирующиеся при нокауте ADAMTS1, функционально связаны с генами, регулирующими апоптоз.

Таким образом, нокаут исследуемого гена существенно меняет транскрипционный профиль клеток исходной клеточной линии HeLa. При этом меняется экспрессия генов, продукты которых задействованы в регуляции репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза. Эти процессы имеют прямое отношение к радиационно-индуцированному клеточному ответу, что объясняет повышение радиочувствительности в нокаутной линии, выражающееся снижением клональной выживаемости и повышением частоты микроядер. В будущем, белок ADAMTS1 может стать потенциальной мишенью противоопухолевых препаратов, повышающих радиочувствительность опухолевых клеток в ходе лучевой терапии злокачественных новообразований.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 8
1.1 Биологические эффекты ионизирующего излучения 8
1.1.1 Основные характеристики ионизирующего излучения 8
1.1.2 Временная шкала радиобиологических эффектов 9
1.1.3 Механизмы воздействия малых и больших доз 13
1.1.4 Индивидуальная радиочувствительность 20
1.2 Радиационно-индуцированный ответ 22
1.2.1 Антиоксидантная защита 23
1.2.2 Узнавание повреждений ДНК 24
1.2.3 Репарация ДНК 25
1.2.4 Регуляция клеточного цикла и апоптоз 29
1.2.5 Иммунный ответ 30
1.3 Вне- и внутриклеточный сигналинг 33
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 43
2.1 Материалы исследования 43
2.2 Схема эксперимента 43
2.3 Обеспечение нокаута и сверхэкспрессии гена *ADAMTS1* 44
2.4 Культивирование и облучение клеточных линий 45
2.5 Оценка клональной выживаемости 46
2.6 Анализ частоты микроядер 46
2.7 Полнотранскриптомный анализ 46
2.7.1 Выделение РНК 46
2.7.2 Очистка РНК 47
2.7.3 Оценка качества РНК 48
2.7.4 Введение флуоресцентной метки в образец РНК 48
2.7.5 Очистка флуоресцентно-меченных образцов РНК 48
2.7.6 Гибридизация меченых образцов РНК на микрочипах 49
2.8 Количественная ПЦР в режиме реального времени 49
2.8.1 Разработка и проверка эффективности олигонуклеотидных праймеров 50
2.8.2 Проведение ПЦР в режиме реального времени 53
2.9 Статистическая обработка данных 54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 66

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ГР – гомологичная рекомбинация

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДР – двунитевые разрывы

ИИ – ионизирующее излучение

НОР – нонсенс-опосредованный распад

НСК – негомологичное соединение концов

РНК – рибонуклеиновая кислота

ВВЕДЕНИЕ

Лучевая терапия наряду с химиотерапией и хирургическими методами является на сегодняшний день одним из основных подходов к лечению рака. В течение нескольких последних десятилетий были достигнуты значительные успехи в применении лучевой терапии, что привело к повышению выживаемости пациентов со злокачественными новообразованиями. Однако успешное применение данного метода осложняется по двум причинам: радиорезистентность клеток опухоли и повреждение клеток нормальной ткани, находящихся в области воздействия ионизирующего излучения. Эти ограничения требуют разработки способов либо радиосенсибилизации опухолевых клеток, либо защиты клеток нормальной ткани от воздействия ионизирующего излучения [Maier et al., 2016]. Поскольку радиочувствительность – во многом генетически детерминированное качество клетки, ткани и организма в целом, поиск путей решения обозначенной выше проблемы необходимо начать с анализа вклада различных генов в формирование индивидуальной радиочувствительности. Таким образом, выявление и всестороннее изучение генов, определяющих индивидуальную радиочувствительность человека, является одной из приоритетных задач в современной лучевой терапии онкологических заболеваний.

В основе индивидуальной радиочувствительности лежат процессы ответа на повреждение ДНК, а именно — процесс репарации, а также различные сигнальные пути [Borràs-Fresneda et al., 2016]. В последнее время всё большая роль в ответе на повреждение ДНК отводится сигнальным путям, включающим взаимодействие с межклеточным матриксом [Eke and Cordes, 2011]. Более того, некоторые авторы приводят исследования роли матрикса в списке ключевых направлений, определяющих будущее радиобиологии [Kirsch et al., 2018]. В связи с этим, возможно, что сигнальные пути с участием компонентов межклеточного матрикса могут играть важную роль в механизмах ответа клеток на радиационно-индуцированное повреждение ДНК и вносить существенный вклад в формирование индивидуальной радиочувствительности человека. Однако, сигнальные пути, связывающие компоненты межклеточного матрикса с процессами ответа на повреждение ДНК, остаются недостаточно исследованными. Выявление механизмов регуляции экспрессии генов, принимающих участие в ответе клеток на повреждение ДНК, позволит глубже понять реализацию такого ответа, расширить имеющиеся представления об отдельных сигнальных путях и, потенциально, связать между собой различные пути регуляции репарации ДНК.

Ранее в лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (г. Томск) были проведены исследования, выявившие гены, дифференциальная экспрессия которых оказалась связана с эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК [Васильев et al., 2015]. Для сравнения были выбраны две группы людей: с наиболее высоким спонтанным уровнем фокусов белков γH2AX, являющихся маркерами эффективности процессов репарации ДНК, при наименьшей частоте радиационно-индуцированных центромеро-негативных микроядер, отражающих уровень повреждения ДНК, и наоборот (с наименее высоким уровнем фокусов при наибольшей частоте микроядер). Проведение полнотранскриптомного анализа и сравнение профилей экспрессии генов между данными группами позволило выявить более 500 дифференциально-экспрессирующихся генов. Ген *ADAMTS1* был выбран для последующего изучения. Связь дифференциальной экспрессии данного гена с эффективностью репарации двунитевых разрывов ДНК была подтверждена в двух различных типах клеток: лимфоцитах периферической крови и фибробластах экстраэмбриональной мезодермы.

Продуктом гена *ADAMTS1* (дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1) является эндопептидаза межклеточного матрикса [Bourd-Boittin et al., 2011], что, на основе вышесказанного, позволяет сделать предположения о его возможной роли в формировании радиационно-индуцированного ответа клеток. Проверка данных предположений требует проведения исследований в модельных системах *in vitro*, в частности — клеточной линии, нокаутной по данному гену, и линией со сверхэкспрессией данного гена. Кроме того, учитывая, что в предварительных исследованиях индивиды отличались по уровню экспрессии множества генов, потенциально продукт гена *ADAMTS1* может участвовать в путях транскрипционной регуляции. Установление путей такой регуляции возможно с помощью проведения полнотранскриптомного анализа профилей экспрессии генов.

Цель диссертационной работы — изучение роли металлопротеиназы межклеточного матрикса ADAMTS1 в формировании индивидуальной радиочувствительности.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить влияние нокаута гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ в клетках посредством оценки клональной выживаемости и частоты микроядер.
2. Провести анализ влияния сверхэкспрессии гена *ADAMTS1* на радиационно-индуцированный ответ в клетках посредством оценки частоты микроядер.
3. Оценить влияние *ADAMTS1* на экспрессионный профиль в клеточной линии HeLa.

Работа выполнена на базе лаборатории цитогенетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ под руководством доктора биологических наук Васильева Станислава Анатольевича.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологические эффекты ионизирующего излучения

Действие ионизирующего излучения на биологический объект вызывает ряд как специфических реакций, имеющих место при ответе на спровоцированные радиацией повреждения, так и неспецифических, отражающих нарушение работы интегрирующих регуляторных систем и активацию компенсаторных механизмов для восстановления гомеостаза [Кузьменко, 2011]. Последствия облучения варьируют в широких пределах для каждого объекта в отдельности и определяются двумя основными факторами: тип/доза излучения, а также радиочувствительность самого объекта – клетки или многоклеточного организма. Последний фактор на самом деле является совокупностью множества характеристик, присущих данному биологическому объекту, и лежит в основе феномена индивидуальной радиочувствительности [Dertinger, H., Jung, 1970].

1.1.1 Основные характеристики ионизирующего излучения

Ионизирующее излучение — потоки фотонов, элементарных частиц или атомных ядер, способные ионизировать вещество [Гусев, 1989]. К ионизирующему излучению не относят видимый свет и ультрафиолетовое излучение, которые в отдельных случаях могут ионизировать вещество. Инфракрасное излучение и излучение радиодиапазонов также не являются ионизирующими, поскольку их энергии недостаточно для ионизации атомов и молекул в основном состоянии [ГОСТ 8.638-2013].

Эффективность взаимодействия ионизирующего излучения с веществом зависит от типа излучения, энергии частиц и сечения взаимодействия облучаемого вещества. Важные показатели взаимодействия ионизирующего излучения с веществом:

- линейная передача энергии (ЛПЭ), показывающая, какую энергию излучение передаёт среде на единицу длины пробега при единице плотности вещества;
- поглощённая доза излучения, показывающая, какая энергия излучения поглощается в единице массы вещества. Именно этот параметр является наиболее важным при изучении воздействия радиации на биологические объекты.

В Международной системе единиц (СИ) единицей поглощённой дозы является грэй, численно равный поглощённой энергии в 1 Дж на 1 кг массы вещества. Иногда встречается устаревшая внесистемная единица – рад (1 рад = 0,01 Гр) [Деньгуб, 1990].

Для некоторых типов излучения более точной характеристикой является эквивалентная доза. Эквивалентная доза равна поглощённой дозе в ткани или органе, умноженной на взвешивающий коэффициент данного вида излучения, отражающий способность излучения повреждать ткани организма. Взвешивающий коэффициент гамма-излучения, рентгеновского излучения, бета-частиц и мюонов для биологической ткани по определению принимается равным единице. В Международной системе единиц (СИ) эквивалентная доза (как и поглощённая) измеряется в джоулях, деленных на килограмм (Дж/кг), то есть имеет такую же размерность. Однако единица измерения эквивалентной дозы имеет специальное название — зиверт (Зв) [Ярмоненко, 2004].

Особенностью, отличающей действие ИИ от действия других повреждающих ДНК агентов, является возникновение кластеров ионизации. Они образуются на концах треков заряженных частиц, когда их скорость снижается и соударения с молекулами становятся более частыми. Не все кластеры образуются вблизи ДНК, однако, если такое происходит, структура ДНК может получить значительные повреждения, наиболее опасным из которых считается двунитевой разрыв ввиду сложности его репарации. Стоит отметить, что двунитевых разрывов образуется меньше, чем однонитевых, и, кроме того, репарация ДНК в значительной степени устраняет образовавшиеся повреждения [Goodhead, 2006].

В любом биологическом объекте при воздействии на него радиации наблюдаются различные изменения клеточных структур, угнетается клеточный цикл, нарушается рост и развитие организма в целом. Как правило, результатом воздействия ИИ на клетки и ткани живых организмов являются морфологические и функциональные изменения, ведущие за собой нарушение физиологических процессов. Негативное действие радиации проявляется на всех уровнях организации живых организмов. ИИ может быть причиной появления различных мутаций, гибели вирусов, клеток и организмов [Кудряшов, 2004]. В целом повреждающее действие ионизирующего излучения на биологические объекты описывается совокупностью определённых механизмов.

1.1.2 Временная шкала радиобиологических эффектов

Изучение биологического действия ИИ, а именно – выяснение механизмов его действия на организмы является первоочередной задачей радиационной биологии. Механизм биологического действия ИИ очень сложен и до конца не выяснен. Однако можно выявить общие закономерности радиационно-химических процессов для разных биологических объектов.

В действии ИИ на биологические объекты можно условно выделить два основных этапа. Первый этап – первичное (непосредственное) действие радиации на биохимические процессы, функции и структуры органов и тканей. На данном этапе ключевую роль играют внутриклеточные механизмы ответа на облучение. Второй этап – опосредованное действие радиации, которое становится причиной появления нейрогенных и гуморальных сдвигов, возникающих на уровне целого организма [Ярмоненко, 2004].

Первичное действие ионизирующего излучения подразделяется на три стадии: физическая, физико-химическая и химическая, а также включает в себя два механизма: прямого и непрямого (косвенного) действия радиации. Прямое действие ионизирующих излучений — это прямое попадание ионизирующих частиц в биологические молекулярные структуры клеток и в жидкие (водные) среды организма. Непрямое, или косвенное — действие свободных радикалов, возникающих в результате ионизации, создаваемой излучением в жидких средах организма и клеток. Свободные радикалы вызывают разрушения целостности цепочек макромолекул (белков и нуклеиновых кислот), что может привести к массовой гибели клеток, канцерогенезу и мутагенезу.

На первой (физической) стадии ионизирующие частицы, пронизывающие высокоорганизованную микрогетерогенную структуру живой клетки, с определенной вероятностью передают часть своей энергии отдельным молекулам, расположенным вдоль треков частиц. Молекулы, поглотившие энергию излучения, переходят в различные возбужденные состояния, часть которых заканчивается ионизацией. Эта стадия длится 10^{-13} с. Ее результатом служит возникновение ионизированных и возбужденных молекул, неравномерно распределенных вдоль треков ионизирующих частиц [Зарицкая, 2007].

Важно отметить, что ключевая роль в повреждении биологических молекул отводится именно косвенному действию ИИ. В результате радиолиза воды возникают диффундирующие водные радикалы (H', OH', $e^-_{гидр}$ и другие), кроме того, в липидной фазе могут возникать высокоактивные перекисные радикалы и другие продукты радиационного окисления, способные передавать энергию молекулам, погруженным в липидную фазу клеток [Молдавский, 1977].

Ионизированные и возбужденные молекулы нестабильны. Процессы, связанные с внутримолекулярной миграцией энергии и диффузией радикалов воды, различными межмолекулярными перестройками возбужденных и ионизированных клеточных структур, относятся к физико-химической стадии действия излучения на клетку, которая длится около 10^{-10} с.

Возникающие первичные продукты, как правило, неустойчивы и быстро претерпевают вторичные превращения, приводящие к образованию биорадикалов,

взаимодействующих друг с другом и с окружающей средой. Взаимодействие биорадикалов друг с другом и с окружающими молекулами приводит к возникновению стойких молекулярных изменений – разнообразных повреждений в структуре молекул, составляющих живую клетку. Рассматриваемая стадия действия излучения – химическая, её продолжительность около 10^{-6} с [Зарицкая, 2007].

В результате перекисного окисления в организме накапливается множество измененных молекул, что приводит к многократному усилению повреждающего действия радиации. В первую очередь это отражается на структуре биологических мембран, у которых изменяются сорбционные свойства и повышается проницаемость (это касается клеточной мембраны, а также мембран митохондрий и лизосом). Изменения в мембранах лизосом приводят к освобождению и активации ДНК-аз, РНК-аз, катепсинов, фосфатаз, ферментов гидролиза мукополисахаридов и ряда других ферментов. Путём диффузии гидролитические ферменты могут достичь любой органеллы клетки. Под действием этих ферментов происходит дальнейший распад макромолекулярных компонентов клетки, в том числе нуклеиновых кислот, белков. Разобщение окислительного фосфорилирования приводит к угнетению синтеза АТФ и к нарушению биосинтеза белков. Кроме того, ионизирующее излучение вызывает образование в тканях организма целого комплекса токсических продуктов, усиливающих лучевой эффект – так называемых радиотоксинов. Среди них наибольшей активностью обладают продукты окисления липидов - перекиси, эпоксиды, альдегиды и кетоны. Образуясь тотчас после облучения, липидные радиотоксины стимулируют образование других биологически активных веществ – хинонов, холина, гистамина и вызывают усиленный распад белков. Будучи введенными необлученным животным, липидные радиотоксины оказывают действие, напоминающее лучевое поражение [Кузин, 1983].

Стоит отметить, что единого мнения относительно механизма прямого и косвенного действий ИИ на биологические объекты нет до сих пор. Так, для объяснения механизма прямого действия в разное время были предложены три модели.

Основоположник отечественной радиобиологии Тимофеев-Ресовский предложил теорию «мишени и попаданий», согласно которой в клетке есть жизненно важный центр (ген или совокупность генов) – «мишень», попадание в которую одной или нескольких высокоэнергетических частиц атомной радиации ведет к разрушению и гибели клетки. Чем больше доза облучения, тем вероятнее попадание в мишень [Тимофеев-Ресовский, 1968]. Стохастическая (вероятностная) теория сводится к тому, что взаимодействие излучений со структурами клетки происходит по принципу случайности и зависимость «доза-эффект» определяется не только прямым попаданием в «мишень», но и состоянием биологического

объекта как динамической системы. По мнению Ю. Г. Капульцевич, разные клетки, подвергнутые облучению в одной и той же дозе, поражаются в разной степени в соответствии с принципом попадания.

Существует также две гипотезы, предлагающие объяснение механизма непрямого действия ИИ на биологические объекты.

Гипотеза первичных радиотоксинов и цепных реакций: в результате действия ИИ в организме образуются группы гуморальных агентов, которые усиливают радиобиологические эффекты. К таким агентам можно отнести липидные радиотоксины [Кузин, 1983]. В норме, окисление липидов регулируется антиокислителями. При воздействии ИИ на клетки печени происходит торможение работы антиокислителей и снижение их количества, как следствие – образование липидных радиотоксинов [Мочалина, 1956]. По мнению авторов гипотезы (Кудряшова Ю. Б., Тарусова Б. Н), первыми структурами, которые поражаются радиацией, являются липиды клеточных мембран. Повреждения этих структур ведут к нарушениям химизма клетки, при этом образуются липидные радиотоксины, которые в свою очередь вызывают окисление других органических соединений живой ткани.

Согласно структурно-метаболической гипотезе, под воздействием ИИ в клетке развиваются не только радиационно-химические процессы, но также синтезируются и дополнительные высокореакционные продукты, которые образуются за счет наличия в организме биохимических механизмов усиления метаболических процессов. Все это, в конечном счете, приводит к повреждению биологически важных макромолекул и к образованию низкомолекулярных токсических метаболитов [Пестовский, 2013].

В конечном итоге структурные повреждения молекул могут привести к различным функциональным нарушениям систем органов. В этом проявляется вторичное действие ионизирующего излучения, иногда этот этап называют четвёртой, биологической, стадией воздействия радиации на организм.

К биологической стадии относятся отдалённые последствия воздействия ионизирующим излучением, под которыми понимают стохастические и соматические эффекты, проявляющиеся через длительное (несколько месяцев или лет) время после одноразового облучения или в результате хронического воздействия радиации. Эта стадия включает в себя: склеротические процессы в различных органах, изменения в функционировании половой системы, лучевую катаракту, заболевания иммунной системы, радиоканцерогенез, генетические и тератогенные эффекты, а также — сокращение продолжительности жизни [Куценко, Бутомко, 2004].

1.1.3 Механизмы воздействия малых и больших доз

Понятия «большая доза» и «малая доза» носят условный характер. Величины больших доз ИИ варьируют и зависят от индивидуальной чувствительности организмов. Для человека большими дозами считаются те, значения которых близки, или выше 1 Гр. Поглощенная доза в 1 Гр является довольно значимой радиационной величиной и может вызвать ряд тяжелых последствий в облученном организме [Курс лекций «Ядерная медицина»].

Большие дозы ионизирующего излучения обладают несомненным деструктивным действием на клетки живых организмов. Повреждения, вызываемые большими дозами облучения, проявляются в течение нескольких часов или дней. Однако, такие эффекты, как раковые заболевания проявляются спустя много лет после облучения - как правило, не ранее чем через одно-два десятилетия. А врожденные пороки развития и другие наследственные болезни, вызываемые повреждением генетического аппарата, по определению проявляются лишь в следующем или последующих поколениях: это дети, внуки и более отдаленные потомки индивидуума, подвергшегося облучению. Величина же дозы, определяющая тяжесть поражения организма, зависит от того, получает ли ее организм сразу или в несколько приемов. Некоторые органы успевают в той или иной степени устранить радиационные повреждения и поэтому лучше переносит серию мелких доз, нежели ту же суммарную дозу облучения, полученную за один прием. Разумеется, если доза облучения достаточно велика, облученный человек погибнет. Во всяком случае, очень большие дозы облучения порядка 100 Гр вызывают настолько серьезное поражение центральной нервной системы, что смерть, как правило, наступает в течение нескольких часов или дней. При дозах облучения от 10 до 50 Гр при облучении всего тела поражение ЦНС может оказаться не настолько серьезным, чтобы привести к летальному исходу, однако существует высокая вероятность гибели человека от кровоизлияний в желудочно-кишечном тракте. При еще меньших дозах может не произойти серьезных повреждений желудочно-кишечного тракта или организм с ними справится, и тем не менее смерть может наступить через один-два месяца с момента облучения главным образом из-за разрушения клеток красного костного мозга-главного компонента кроветворной системы организма: от дозы в 3-5 Гр при облучении всего тела умирает примерно половина всех облученных [Банников, 1990].

Большим дозам радиации после взрыва Чернобыльской АЭС подвергалось население близлежащих территорий, а также ликвидаторы последствий аварии. Длительность облучения варьировала от нескольких минут до нескольких часов. У

пострадавших, подвергшихся относительно равномерному облучению в дозе 1-12 Гр, развивалась костно-мозговая форма лучевой болезни, диагностировались уменьшение клеток гемопоэза и поражения кожи. Большинство людей, получивших дозу более 6 Гр, умерли в первые три месяца после аварии [Гуськова, 1988]. В качестве примера воздействия больших доз радиации также можно привести исследования последствий ядерных испытаний на Семипалатинском полигоне, проводившихся в период с 1949 по 1962 гг. Максимальные дозы облучения населения в период проведения ядерных испытаний были получены после первого взрыва, когда не принимались никакие меры для снижения радиационной опасности. В исследовании было показано, что даже через 40-45 лет после первого взрыва у населения регистрируется повышенный уровень нестабильных хромосомных аберраций [Снигирёва, 2011].

Диапазон малых доз исследователи определяют исходя из физического и биологического смысла данного понятия. С физической точки зрения малая доза ионизирующей радиации соответствует одному событию пролёта частицы сквозь заданный объём. Однако следует иметь ввиду, что разные дозы ионизирующей радиации могут обладать различной биологической эффективностью в зависимости от типа излучения, вида организма и ткани, стадии клеточного цикла и особенностей генотипа. Кроме того, при облучении в малых дозах возможно обнаружение эффектов, которые не выявляются в диапазоне больших доз. Так, процесс взаимодействия ионизирующих излучений в малых дозах с гетерогенными биологическими структурами имеет стохастический характер, тогда как для больших доз он является детерминированным. Малые дозы иногда определяют как не приводящие к гибели организма и не вызывающие серьёзных нарушений жизнедеятельности. Данное определение восходит к положению о нормировании дозовой нагрузки, согласно которому накопленная доза не должна превышать порог возникновения вредных облучения (например, лучевая болезнь), а вероятность появления вредных стохастических эффектов (например, лейкозов) должна оставаться на приемлемо низком уровне. В этой связи научный комитет по атомной энергии при ООН рекомендует называть малыми дозами ИИ дозы менее 200 мГр. Также малые дозы можно определять и как дозы, при которых преобладают «немишенные» эффекты (эффект «свидетеля», генетическая нестабильность, отсроченная гибель клетки). В радиационной биологии понятие «малая доза» обычно означает величину дозы, с которой начинается проявление исследуемых эффектов. В различных областях радиобиологии верхняя граница малых доз варьирует, некоторые авторы за значения верхней границы принимают 200 мГр для человека и 500 мГр для других млекопитающих [Василенко, 2011].

Биологические эффекты, вызываемые малыми дозами, имеют ряд принципиальных отличий от эффектов больших доз (Таблица 1).

Таблица 1 — Биологические эффекты больших и малых доз ИИ (по Василенко, 2011)

Вызываемый эффект	**Малые дозы**	**Большие дозы**
Основой способ повреждения ДНК	Косвенный (свободные радикалы ОН·)	Прямое попадание в ДНК, свободные радикалы
Основные типы повреждения ДНК	Однонитевые разрывы, повреждение оснований	Одно- и двунитевые разрывы, повреждение оснований
Индуцируемые мутации	Точечные мутации, микроделеции в рецессивном гетерозиготном состоянии	Хромосомные аберрации (мосты, фрагменты хромосом)
Индукция киназы ATM	Неэффективна	Эффективна
Изменение экспрессии генов	Гены, контролирующие передачу меж- и внутриклеточных сигналов	Гены, контролирующие пролиферацию клеток и апоптоз
Преобладающий тип радиационного ответа	«Немишенный»	«Мишенный»
Зависимость эффекта от дозы облучения	Нелинейная (гиперчувствительность или гормезис)	Повреждающий эффект прямо пропорционален дозе

Эффекты, вызываемые воздействием ИИ на живые объекты, можно разделить на генетические и соматические. Как уже упоминалось выше, эти эффекты различны для малых и больших доз. Так, среди генетических эффектов воздействия ИИ в малых дозах можно выделить мутагенез, трансгенерационную нестабильность генома и радиоадаптацию [Котеров и др., 2015].

Мутагенный эффект при воздействии малых доз ИИ возникает преимущественно косвенным путём – через образование продуктов радиолиза воды (свободные радикалы гидроксила, водорода и гидратированный ион). Эти радикалы взаимодействуют не только непосредственно с ДНК, но и кислородом, дополнительно образуя его активные формы (пероксид водорода, радикал гидропероксида и супероксид). Следует иметь ввиду, что указанные радикалы могут образовываться и эндогенно, вызывая повреждения ДНК на

клетку в 1000 выше, чем аналогичные повреждения в условиях естественного радиационного фона. Однако повреждения, индуцированные ИИ, возникают кластеризованно с высокой концентрацией вдоль трека частицы, из-за чего существенно меняется качественный характер этих повреждений (например, чаще возникают двунитевые разрывы). Оксидативное повреждение ДНК ведёт к образованию модифицированных оснований, сайтов без основания, деструкции дезоксирибозы, появлению одно- и двунитевых разрывов, сшивок ДНК–белок. В процессе свободнорадикального повреждения ДНК образуется свыше 100 типов окисленных оснований, из которых наиболее распространённым является 8-оксо-2`-деоксигуанозин. Почти для каждого типа нарушений существует определённый тип репарации.

В некоторых случаях индуцируются эпигенетические изменения, которые ведут к увеличению уровня мутагенеза лишь у потомков облученных организмов. Это явление получило название «трансгенерационная нестабильность». Облучение половых клеток родителей приводит к возникновению различных мутаций у потомства, что проявляется в повышенной частоте врожденных уродств, мертворождениях и постнатальной гибели. Эффекты в потомстве проявляются даже тогда, когда облучению подвергнут лишь один из родителей (например, отец). Помимо повышения темпов мутирования в зародышевой линии и соматических тканях потомков облучённых родителей, трансгенерационная нестабильность приводит к увеличению риска возникновения раковых заболеваний. В настоящий момент известен широкий спектр трансгенерационных изменений в соматических тканях потомков: от рака до изменения поведенческих реакций и способности к оплодотворению. Так, у потомков облученных самцов мышей в первом поколении наблюдали повышенную частоту хромосомных аберраций, а также достоверное повышение частота микроядер в клетках головного мозга.

Под адаптацией к облучению понимают такое приспособление к радиационной нагрузке, которое делает возможным сохранение жизнеспособности, поддержание фертильности и нормальной функциональной стабильности всех структур биологического объекта в условиях дальнейшего воздействия излучения. На практике для оценки радиационной адаптации используют радиорезистентность организма и клеток его критических органов. Следует заметить, что в условиях повышенного радиационного воздействия как в модельных, так и в природных популяциях растений и животных увеличивается устойчивость к дополнительному облучению, однако организмы при этом несут больший генетический груз (хромосомные аберрации), чем особи контрольных популяций, обитающих на территориях с низким радиационным фоном.

Соматические эффекты проявляются ответом различных сигнальных систем, радиационно-индуцированными гибелью клетки или генетической нестабильностью; их можно разделить (Рисунок 1) на гиперчувствительность, пониженную чувствительность и гормезис (в том числе адаптивный ответ). Также довольно часто в область малых доз экстраполируют данные, для которых известно о линейной зависимости повреждающего эффекта от дозы в области больших доз [Mancuso et al., 2012].

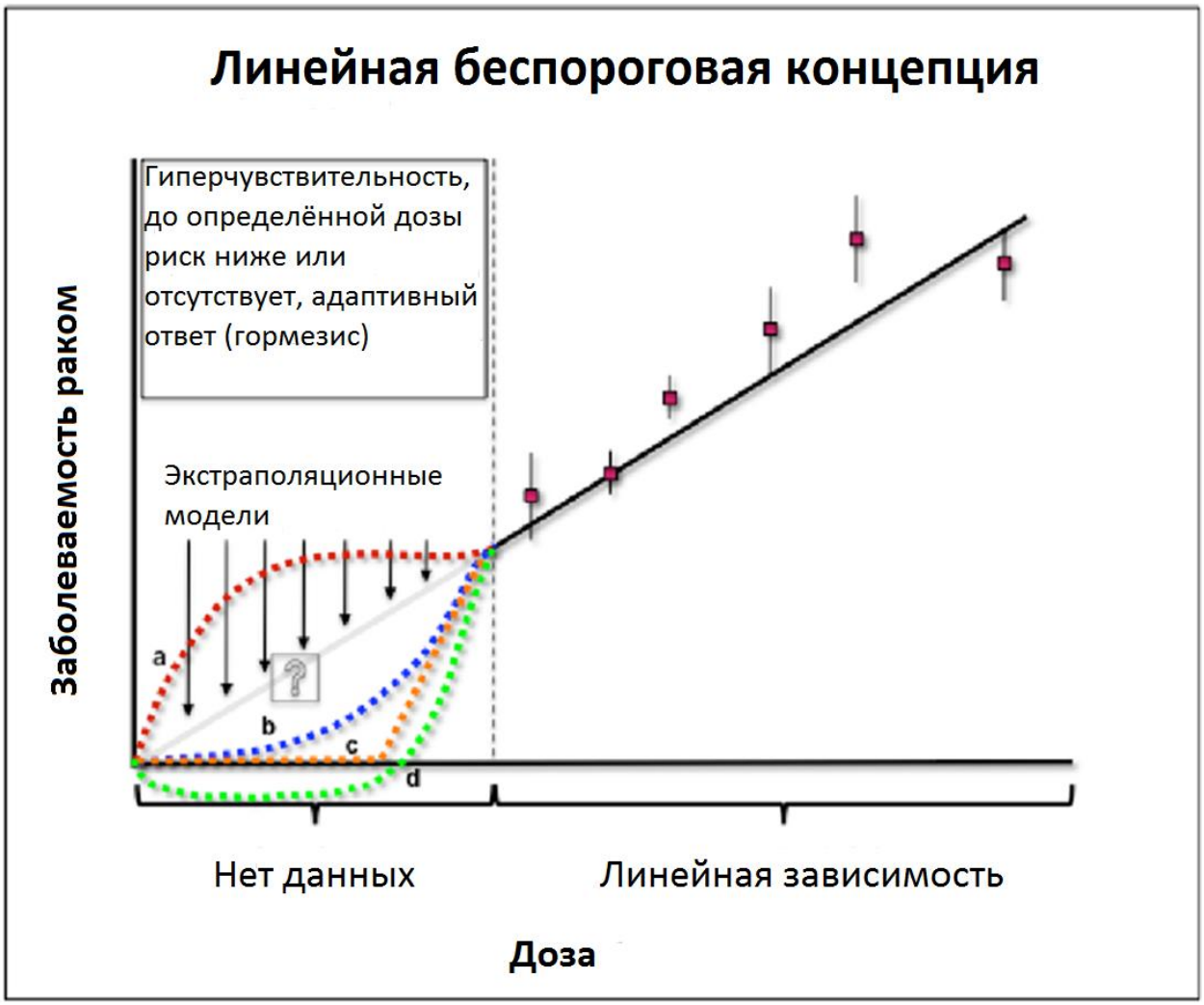

Рисунок 1 – Линейная беспороговая концепция и неопределенности в экстраполяции радиационного риска при малых дозах (по Mancuso et al., 2012).

Примечание: Данная концепция используется для оценки долгосрочных эффектов радиации, таких как рак и различные генетические эффекты. Тем не менее, существуют научные проблемы, которые могут поставить под вопрос обоснованность нынешнего подхода, в том числе эффект наблюдателя, особенно выраженный при низких дозах. Таким образом, концепция представляется прагматичным методом оптимизации процедур и правил, а не научной моделью, обусловленной текущим состоянием знаний о сложных

процессах, связанных с оценкой риска. Гипотетические кривые в области низких доз: (a) изогнутая вверх кривая с нисходящим изгибом - риск выше, чем прогнозируется линейной беспороговой концепцией; (б) изогнутая вниз - риск ниже, чем прогнозируется линейной беспороговой концепцией; (c) кривая с резким восходящим изгибом - без риска до определенной дозы; (d) благоприятный биологический ответ на воздействие низких доз – гормезис (в том числе адаптивный ответ).

Под гиперчувствительностью к малым дозам радиации подразумевается повышенный уровень гибели клеток в культуре в сравнении с прогнозируемым уровнем, предсказываемым исходя из линейно-квадратичной модели. Последующий возврат к линейно-квадратичным значениям или их превышение соответствует радиорезистентности. Таким образом, феномен гиперчувствительности заключается в том, что малые значения поглощенной дозы ИИ могут приводить к большему эффекту, чем более высокие значения поглощённой дозы. В 1954 году, в результате испытаний ядерного оружия жители Маршалловых островов были подвержены воздействию радиоактивных осадков. Значения дозы облучения находилось в диапазоне 0,14-0,78 Гр. В течение первых двух недель после облучения наблюдалось незначительное снижение уровня лейкоцитов и нейтрофилов, уровень лимфоцитов также был ниже нормального. По данным гематологических обследований, у лиц, профессионально связанных с источниками ионизирующих излучений, выявлены тенденции к снижению количества лейкоцитов, тромбоцитов и к увеличению числа лимфоцитов [Солдатов, Ушаков, 1995]. В исследованиях Ивановского И. А. был описан ранее не известный эффект действия сверхмалых доз ИИ – дисфункции двигательной активности мерцательного эпителия животных. Впервые было показано, что облучение сверхмалыми дозами γ-радиации может стать причиной сбоя двигательной активности клеток [Ивановский, 2006]. Данные этих исследований соответствуют представлениям о повреждающем эффекте малых доз радиации. Гиперчувствительность может быть объяснена присутствием субпопуляции клеток, имеющих повышенную чувствительность в силу определённой стадии клеточного цикла или генетической предрасположенности (например, пониженного окислительно-восстановительного статуса). В свою очередь с увеличением дозы возрастает устойчивость, поскольку начинают более эффективно индуцироваться защитные механизмы, такие как репарация ДНК или подавление апоптоза.

Линейная беспороговая концепция гласит, что не существует порога или предела, ниже которого перестают осуществляться эффекты, наблюдающиеся при больших дозах. Такая зависимость была установлена в рамках проекта "Изучение состояния здоровья

взрослого населения Нагасаки". В ходе проекта была сформирована выборка из 2587 человек. Было определено, что в исследуемой категории индивидов поглощенная доза щитовидной железы составляла 0,1-0,3 Гр, что относится к диапазону малых доз. Испытуемые проходили через комплексное обследование, включающее стандартные методики для выявления заболеваний щитовидной железы, а также ультразвуковое обследование. С помощью построения логистических моделей была установлена взаимосвязь между степенью тяжести тиреоидных патологий и величиной полученной дозы, полом и возрастом. Установлена линейная зависимость доза-эффект для онкологических заболеваний. Подтверждена зависимость между возрастанием частоты заболеваний и повышением дозы облучения щитовидной железы [Nagataki, 1994].

Гормезис – обозначение инверсионной биологической, физиологической или биохимической реакции организма на «малые» дозы какого-либо воздействия, противоположной той, которая развивается на более высокие дозы. В некоторых исследованиях установлено, что превышение показателей естественного радиационного фона (хроническое облучение при малой мощности дозы, ЕРФ) в 3-10 раз не приводит к отрицательным последствиям. Mason T.J. и Miller R.W., при исследовании смертности от всех видов рака у населения, проживающего в сельской местности и городах США, расположенных как высоко над уровнем моря (более 3000 футов), так и в местностях, расположенных на уровне моря, установили, что повышенная радиация на больших высотах может быть причиной снижения смертности [Mason, Miller, 1974]. Также установлено, что правильное использование малых доз ИИ в качестве терапии против некоторых заболеваний не ведет за собой серьезных последствий. У 22 000 больных гипертиреозом, получавших I-131, не обнаружен рост заболеваемости лейкемией по сравнению с 14 000 аналогичных больных, которым было назначено другое лечение [Jalow, 1994]. Различают фоновый радиационный гормезис, обусловленный адаптацией организмов к воздействию природной радиоактивности, и стрессовый радиационный гормезис, возникающий благодаря эндогенным защитным механизмам и метаболической адаптации к внешнесредовым стрессам, особенно климатическим перепадам. Большие дискуссии вызывают молекулярные механизмы радиационного гормезиса. Малые дозы радиации оказывают двойное действие. При низкодозовом воздействии частота повреждений ДНК оказывается на несколько порядков меньше, чем от эндогенных источников, например таких, как АФК (активные формы кислорода). В то же время имеет место вызываемая радиотоксинами адаптивная защита от повреждений ДНК, индуцируемых другими, преимущественно – эндогенными источниками. Радиационно-индуцированный апоптоз и терминальная дифференцировка клеток повышают репарацию

ДНК, снижают геномную нестабильность и число мутантных клеток в тканях. Таким образом, при низких дозах облучения эффект индукции защиты от эндогенных источников повреждений превышает индукцию радиогенных повреждений или равен ей, что в целом оказывает стимулирующее действие.

1.1.4 Индивидуальная радиочувствительность

В широком смысле радиочувствительность можно определить как «способность биологической сущности быть модифицированной с помощью излучения» [Cassarino, Bennett, 1999]. Под индивидуальной радиочувствительностью понимают радиочувствительность, присущую конкретному организму или биологическому объекту [Dertinger, Jung, 1970]. Индивидуальная радиочувствительность является сложным признаком, который обусловлен действием как генетических, так и средовых факторов. Кроме того, радиочувствительность является индивидуальным признаком, варьирующим от индивида к индивиду в пределах одного вида [Горохов, 1994].

Для млекопитающих характерен диапазон распределения особей по степени индивидуальной радиочувствительности. Так, большая часть особей характеризуется средней чувствительностью к действию радиации, 14–20 % оказываются заметно более радиорезистентными, а 10–20 % – заметно более радиочувствительными. Разница в реакции на радиацию между радиочувствительными и радиорезистентными особями может быть многократной. Кроме того, в литературе имеются данные, свидетельствующие о разной индивидуальной радиочувствительности. Показано, например, что существует широкая индивидуальная изменчивость по частоте вызванных радиацией аберраций хромосом в лимфоцитах периферической крови при одинаковой радиационной нагрузке [Bekoff, 2000].

За годы изучения этого феномена накоплен значительный фактический материал, касающийся, в первую очередь, сравнительных аспектов. Так, на воздействие радиации неодинаково реагируют клетки на различных стадиях клеточного цикла и клеточной дифференцировки; разные типы клеток; клеточные линии, полученные от разных типов млекопитающих, а также от здоровых людей и пациентов с различными генетическими нарушениями. Индивидуальная радиочувствительность также сильно варьирует на уровне отдельных организмов [Копылов, 1984]. Поскольку многоклеточный организм, как и отдельная клетка, является динамической структурой, его восприимчивость к ионизирующему излучению также меняется во времени. Это зависит от стадии онтогенеза, а также от исходного состояния некоторых систем. Так, показана корреляция между

индивидуальной радиочувствительностью и некоторыми параметрами функционирования кроветворной и гормональной систем, газообмена [Григорьев, 1979].

По относительной радиочувствительности с учетом пролиферативной потенции и степени дифференцировки различают несколько классов клеток [Ярилин, 1997].

Класс 1 – вегетативные интермитотические клетки. Это быстро делящиеся, короткоживущие, радиочувствительные клетки, дочерние клетки которых или дифференцируются, или образуют клетки, подобные родительским. В этот класс входят такие клетки как гемоцитобласты, лимфобласты, эритробласты, миелобласты, клетки крипт кишечника, клетки слизистой оболочки желудка, сперматогонии типа А, овогонии, эпидермальные клетки, лимфоциты. Лимфоциты принадлежат к этому классу не потому, что они быстро пролиферируют, а благодаря их высокой радиочувствительности, лежащей в основе интерфазной гибели при низких дозах радиации. Так как опухолевые клетки способны к быстрой пролиферации их тоже можно отнести к этому классу.

Класс 2 – дифференцирующиеся интермитотические клетки. Они обладают весьма высокой скоростью пролиферации. Образующиеся дочерние клетки дифференцируются и становятся радиорезистентными. Это клетки промежуточных стадий миелопоэза, эритропоэза, сперматогонии типа В и овогонии.

Класс 3 – мультипотентные соединительнотканные клетки. Эти клетки делятся нерегулярно в ответ на повреждение и раздражение. К ним относятся эндотелий, фибробласты и мезенхимальные клетки.

Класс 4 – покоящиеся постмитотические клетки. Эти клетки относительно радиорезистентны и в норме не делятся. Примерами их могут служить эпителиальные клетки слюнных желез, печени, почек, поджелудочной железы и легких, ретикулярные клетки кроветворной ткани, интерстициальные клетки семенников и яичников, паренхиматозные клетки потовых и эндокринных желез.

Класс 5 – фиксированные постмитотические клетки. Эти клетки не делятся, они высокорадиорезистентны. К ним относятся зрелые нервные и мышечные клетки, сперматозоиды и эритроциты.

Радиочувствительность органа зависит не только от радиочувствительности тканей, составляющих данный орган, но и от его функций. На основании морфологических признаков поражения органы и ткани распределяются в следующем нисходящем порядке: лимфоидные органы (лимфатические узлы, селезенка, зобная железа, лимфоидная ткань других органов), костный мозг, семенники, яичники, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта. Еще меньше поражаются кожа с придатками, хрящи, кости, эндотелий

сосудов. Высокой радиоустойчивостью обладают паренхиматозные органы: печень, надпочечники, почки, слюнные железы, лёгкие [Зарицкая, 2007].

Определяющим фактором индивидуальной радиочувствительности является регуляция гомеостаза. При радиационном воздействии, вызывающем нарушение динамического равновесия в организме, наступает повреждение систем, функционирование которых направленно на устранение повреждения [Arjona, 2006]. Индивидуальную радиочувствительность можно изучать с позиции этой концепции и искать связь между эффективностью гомеостатических регуляторных механизмов и индивидуальными проявлениями радиационного повреждения [Mossad, 2003]. Из вышесказанного можно заключить, что реакции организма в ответ на повреждающее действие радиации не исчерпываются автономными изменениями физиологических параметров и функций, а представляют собой взаимообусловленный интегральный ответ разнообразных функциональных систем.

1.2 Радиационно-индуцированный ответ

Разные типы и дозы излучения неодинаково действуют на различные типы клеток, однако общий механизм ответа на действие радиации в большинстве случаев сохраняется [Kovalev, 1996]. Ионизирующее излучение, вызывая серьёзные повреждения ДНК, оказывает влияние на жизнедеятельность клетки, а, в конечном счёте, – всего организма. При этом на каждом уровне организации осуществляется определённый этап радиационно-индуцированного ответа. Так, одним из наиболее ранних событий является фосфорилирование гистонов H2AX при участии специфических киназ. Это приводит к активации систем репарации ДНК, устраняющих одно- и двунитевые разрывы. Способность клеток к эффективной репарации ДНК является основополагающей для поддержания геномной стабильности и, как следствие, – жизнеспособности клетки. Параллельно с этим начинает усиливаться антиоксидантная защита, необходимая для того, чтобы ликвидировать активные формы кислорода, образующиеся под воздействием радиации. Если число повреждений слишком большое и системы репарации не справляются с восстановлением исходной структуры ДНК, то в процесс включаются белки-регуляторы клеточного цикла, не допуская клетку к делению, что в дальнейшем приведёт либо к восстановлению генетического материала и нормальному делению, либо к запуску апоптоза. В редких случаях по тем или иным причинам клетка не погибает, и на четвёртом этапе элементами клеточного и гуморального иммунитета осуществляется распознавание и уничтожение повреждённых клеток, в которых начались некротические процессы.

Достижение гомеостаза возможно только при условии координации сложных процессов, указанных выше. Для этого необходимо стабильное функционирование вне- и внутриклеточных сигнальных систем, одним из важнейших звеньев которых являются ферменты межклеточного матрикса.

1.2.1 Антиоксидантная защита

Активные формы кислорода (АФК) образуются в процессе жизнедеятельности организмов как продукты нормального клеточного метаболизма, а также под воздействием факторов окружающей среды, таких как ультрафиолетовое излучение, сигаретный дым и так далее. АФК являются высокореактивными молекулами и могут повреждать различные клеточные структуры, в том числе — нуклеиновые кислоты, изменяя при этом их функции. Аэробные организмы имеют интегрированные антиоксидантные системы, которые включают ферментативные и неферментативные антиоксиданты, эффективно нейтрализующие вредное воздействие АФК. Изменение баланса между окислителями и антиоксидантами в пользу окислителей называется «окислительным стрессом». Регулирование восстановительного и окислительного (окислительно-восстановительного) состояния имеет решающее значение для жизнеспособности клеток, активации, пролиферации и работы органов. При патологических состояниях антиоксидантные системы могут быть перегружены. Окислительный стресс способствует развитию многих патологических состояний и заболеваний, включая рак, неврологические расстройства, атеросклероз, гипертонию, ишемию, диабет, острый респираторный дистресс-синдром, идиопатический фиброз легких, хроническую обструктивную болезнь легких и астму [Birben et al., 2012].

На сегодняшний день среди онкологов нет единого мнения относительно необходимости применения антиоксидантов одновременно с химио- или радиотерапией онкологических заболеваний. Многие специалисты придерживаются позиции, что антиоксиданты по своей природе подрывают свободнорадикальный механизм химиотерапии и радиотерапии, и поэтому во время лечения от них следует отказаться. С другой стороны, высказывается мнение, что антиоксиданты, принимаемые во время лечения рака, не только ослабляют некоторые из побочных эффектов этого лечения, но и повышают эффективность основной терапии. Согласно исследованиям, лучевая терапия приводит к снижению уровня глютатиона, витамина Е и селена у больных раком шейки матки. При этом, напротив, уровень перекиси липидов был повышен. Также наблюдались отклонения в работе следующих ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы,

глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Кроме того, исследователи сделали вывод, что самостоятельное восстановление антиоксидантных систем занимает длительное время. Таким образом, было установлено, что снижение антиоксидантной защиты не только вызывает выраженные побочные эффекты, но и приводит к вторичному возникновению рака [Moss, 2007].

1.2.2 Узнавание повреждений ДНК

Одним из наиболее ранних событий репарации, происходящим через 5-30 минут после индукции двунитевого разрыва, является фосфорилирование гистона H2AX, расположенного в местах образования повреждений. Это осуществляется при участии трёх киназ: ATM, ДНК-ПКcs и ATR. Однако, для функционирования этих киназ необходимы дополнительные белковые комплексы, состоящие из нескольких компонентов: одни санируют ДНК и распознают повреждения, другие активируют сами киназы и транспортируют их к местам разрывов, третьи служат адаптерами, с помощью которых фосфорилирование гистона распространяется в обоих направлениях [Falck et al., 2005].

Основным белком, фосфорилирующим гистоны по местам ДР, является ATM (белок, мутированный при атаксии телеангиоэктазии). Для обнаружения ДР и активации ATM необходим ещё один белковый комплекс – MRN, в состав которого входит белок NBS1 – продукт гена, мутирующего при синдроме хромосомной нестабильности Ниймегена. Пациенты с указанными синдромами отличаются повышенной чувствительностью к радиации [O'Driscoll, Jeggo, 2006]. Комплекс MRN непосредственно связывается с ДНК, обеспечивает транспортировку ATM к местам разрыва. Кроме того, показано, что сборка данного комплекса в местах ДР происходит быстрее, чем любых других белков, также это – единственный из известных репаративный комплекс ДНК, который для образования внутриядерных гранул не нуждается в других белках.

Не менее важным является белок MDC1, играющий роль медиатора, который непосредственно связывается с ATM и уже фосфорилированным гистоном H2AX, распространяя фосфорилирование в обоих направлениях от разрыва. Распространение сигнала существенно меняет структуру хроматина, примыкающего к ДР, что, как считается, играет важную роль в обеспечении доступа белков репарации к ДНК [Stucki, Jackson, 2006].

При отсутствии в клетках белка ATM фосфорилирование H2AX осуществляется по альтернативному механизму, при этом задерживаясь во времени. В подобных случаях узнавание повреждений проходит с участием каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПКcs), которая близка по структуре к ATM и играет

важную роль в процессе негомологичного соединения концов при репарации ДНК. Сенсорную функцию выполняет комплекс Ku70-Ku-80. Стоит отметить, что в интактных клетках ATM препятствует фосфорилированию под действием ДНК-ПКcs. Третьей киназой, способной фосфорилировать H2AX, является ATR, которая привлекается к сайтам повреждений с помощью белка ATRIP (ATR interacting protein). Данный фермент не играет существенной роли в обнаружении радиационно-индуцированных повреждений, однако, принимает участие в репарации ДНК после активации ATM. Всего в ответ на повреждение ДНК вышеописанными киназами фосфорилируется, в общей сложности, не менее 700 белков [Matsuoka et al., 2007].

Таким образом, особыми белками осуществляются поиск повреждений ДНК и запуск сигнальных путей, вызывающих дальнейшие события радиационно-индуцированного ответа клетки. Эти события протекают при участии множества других белков: белков, участвующих в процессе репарации, компонентов антиоксидантной системы, регуляторов клеточного цикла и проапоптотических белков, стимуляторов иммунного ответа.

1.2.3 Репарация ДНК

Их всех повреждений, которые индуцирует в клетке ионизирующее излучение, наиболее опасными являются нарушения структуры и целостности генетического аппарата. Радиация может спровоцировать различные типы повреждений, наиболее опасными из которых являются разрывы ДНК. Разрывы, в свою очередь, могут быть одно- или двунитевыми; в обоих случаях это – серьезная угроза для геномной стабильности и, как следствие, – для жизнедеятельности клетки. Неспособность устранить двунитевой разрыв может привести к потере хромосомы, хромосомным перестройкам, апоптозу или канцерогенезу [Borrego-Soto et al., 2015]. Можно заключить, что именно двунитевые разрывы ДНК наиболее генотоксичны. При нарушенных системах репарации такие повреждения не будут эффективно устраняться. В совокупности эти два фактора обуславливают гибель клетки путём апоптоза или начало канцерогенеза [Mori et al., 2018].

Существует несколько систем реагирования для борьбы с многочисленными повреждениями ДНК, сохраняющих целостность генома. В случае двунитевых разрывов ДНК основными являются два механизма: негомологичное соединение концов (НСК) и гомологичная рекомбинация (ГР) [Huertas, 2010].

Двунитевые разрывы ДНК возникают в ходе клеточного цикла эукариотических клеток под действием множества факторов. Различные причины появления двунитевых

разрывов приводят к различному химическому составу концов ДНК, которые необходимо исправить. Эволюция ферментов НСК демонстрирует замечательную степень структурной толерантности в диапазоне конфигураций концевых субстратов ДНК, на которые они могут воздействовать [Vignard et al., 2013]. В клетках позвоночных основные ферменты данного пути репарации – нуклеаза, полимераза и лигаза – являются наиболее гибкими и многофункциональными ферментами в каждом из своих классов. Возможно, наиболее интригующим аспектом НСК является разнообразие субстратов, которые данный путь может преобразовывать в объединенные продукты. Это требует высокого уровня механистической гибкости на уровне взаимодействия белок-субстрат и не имеет аналогов в большинстве других биохимических процессов. В отличие от путей восстановления для более определенных повреждений (например, эксцизионная репарация нуклеотидов), репаративные ферменты НСК действуют в любом порядке и могут функционировать независимо друг от друга на каждом из двух соединяемых концов ДНК. НСК имеет решающее значение не только для восстановления патологических двунитевых разрывов, но также и для восстановления физиологических двунитевых разрывов, образовавшихся во время рекомбинации. Следовательно, пациенты, у которых отсутствует нормальная репарация путём негомологичного соединения концов, не только чувствительны к ионизирующей радиации, но также имеют серьезный иммунодефицит [Lieber, 2011].

Начальным этапом является распознавание и связывание гетеродимера Ku, состоящего из субъединиц Ku70 и Ku80, с двунитевым разрывом ДНК. Как только гетеродимер Ku связывается с концами разрыва, он становится своеобразным каркасом для связывания других ферментов негомологичного концевого соединения с сайтом повреждения: ДНК-зависимой протеинкиназы (ДНК-ПКcs), рентгеноструктурного белка 4 (XRCC4), ДНК-лигазы IV (15), XRCC4-подобного фактора (XLF) и фактора аппатаксина и PNK (APLF). Ku70/80 рекрутирует ДНК-ПКcs на концы повреждённой ДНК с образованием активного комплекса ДНК-ПКcs. Связывание ДНК-ПКcs с комплексом ДНК-Ku приводит к транслокации гетеродимера Ku внутрь по цепи неповреждённой двуцепочечной ДНК и, в конечном итоге, приводит к активации киназы ДНК-ПКcs. Далее Ku взаимодействует с комплексом XRCC4/ДНК-лигаза IV и также рекрутирует его на концы ДНК. XRCC4 непосредственно взаимодействует с субъединицей Ku70 гетеродимера Ku, тогда как ДНК-лигаза IV взаимодействует с гетеродимером. В свою очередь, XRCC4 может стать «вторичным каркасом» и также рекрутировать необходимые белки на концы разрыва. Преобладающей на сегодняшний день моделью для НСК является последовательное, поэтапное присоединение каждого компонента. Так, после привлечения Ku на концы цепей, к нему присоединяется ДНК-зависимая киназа, затем Ku вместе с ДНК-ПКcs рекрутирует

к месту разрыва другие ферменты вплоть до комплекса XRCC4/лигаза-IV. После завершения присоединения всех ферментов Ku70/80 связывается с концами ДНК и помогает поддерживать их стабильность, защищая их от неспецифической обработки. Следующий шаг, если он необходим, – обработка концов ДНК для того, чтобы они стали лигируемыми. При разрыве в структуре нуклеотидов могут появиться неспецифические группы, блокирующие дальнейшее лигирование. В зависимости от характера разрыва могут потребоваться различные ферменты, которых в настоящее время известно довольно много. После устранения неспецифических групп происходит лигирование концов разорванных цепей. Таким образом, структура молекулы ДНК восстанавливается (Рисунок 2) [Davis, Chen, 2013].

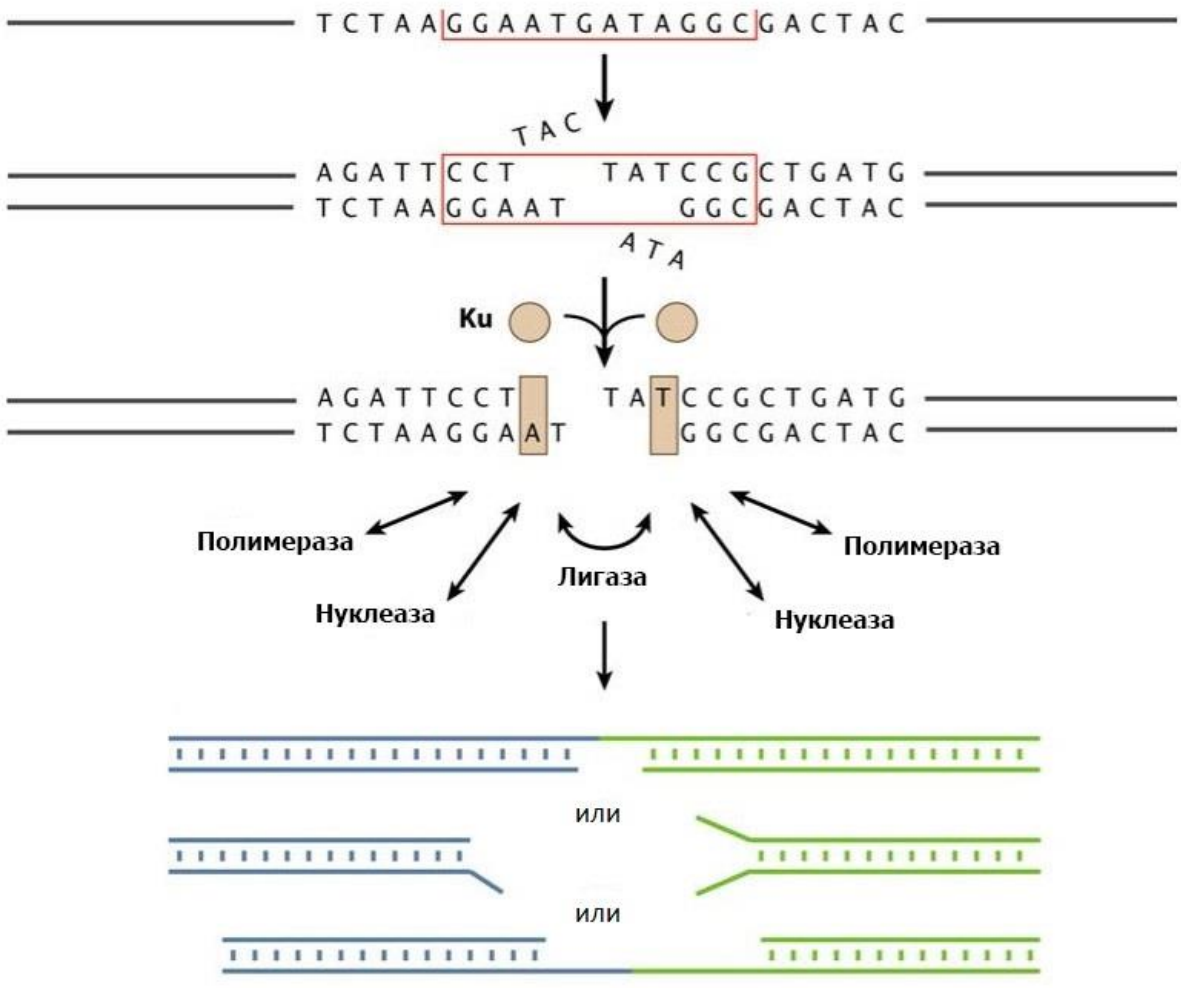

Рисунок 2 — Основные этапы репарации ДНК путём негомологичного соединения концов (по Davis et al., 2013).

Если при облучении клетки в ДНК образуется разрыв с липкими концами, то эти концы необходимо достроить. Достройка осуществляется с участием специфических (нерепликативных) полимераз. В итоге при секвенировании участков ДНК, репарированных по механизму НСК, часто можно обнаружить небольшие инсерции. Кроме того, в подготовке концов ДНК к лигированию участвует белок с функцией эндонуклеазы – Artemis. Данный фермент обеспечивает «зачистку» концов на месте разрыва. При активации ДНК-ПКcs происходит не только аутофосфорилирование, но и фосфорилирование Artemis, в результате чего нуклеазная активность усиливается. Поэтому в местах разрывов часто присутствуют небольшие делеции. Всё это в конечном счёте приводит к тому, что при репарации ДНК путём НСК возникают ошибки, отрицательно сказывающиеся на стабильности генома [Mahaney et al., 2010].

Гомологичная рекомбинация является одним из основных способов репарации двунитевых разрывов ДНК. Для осуществления репарации по данному механизму необходим гомологичный участок ДНК, который находится на сестринской хроматиде, поэтому ГР возможна только в S- и G_2-фазах клеточного цикла. Значительная часть ранних представлений о том, как ГР используется для восстановления разрывов нитей, возникла в результате исследований разрывов, вызванных γ-облучением, в плазмидной ДНК дрожжей в 1970 – 1980 годах. Так, одна из первых подобных моделей, основанная на сопряжении разорванных концов с гомологом, была предложена Ресником в 1976 [Jasin, Rothstein, 2013].

На сегодняшний день известно несколько моделей, объясняющих механизм репарации ДНК с участием системы гомологичной рекомбинации. В соответствии с наиболее распространённой моделью процесс репарации условно подразделяется на три фазы. В первой, пресинаптической, фазе репарации происходит нуклеазное расщепление концов разрыва. В создании одноцепочечных 3’-ОН-выступающих концов ДНК в месте разрыва принимают участие белки семейства RecQ, которые обладают как хеликазной, так и экзонуклеазной активностями. Хеликазы расплетают двухцепочечную молекулу ДНК в месте разрыва и гидролизует одну из цепей в направлении 5’ → 3’, оставляя выступающий одноцепочечный участок. На данном этапе также существенную роль играет вышеописанный белковый комплекс MRN. Образующиеся одноцепочечные участки сразу же покрываются белком RPA, который затем замещается на основной белок ГР – RAD51. Во второй фазе наблюдается синапсис гомологичных участков двух молекул ДНК с вхождением комплементарного одноцепочечного участка в ДНК-дуплекс и последующим репаративным синтезом ДНК. Узнавание неповреждённого гомологичного участка и обмен цепями, необходимыми для рекомбинации, происходят с участием белка RAD51 и нескольких паралогичных ему генов. Расширение образовавшихся синапсов происходит

при помощи белков семейства RecQ и, возможно, – RAD54. Синтез ДНК осуществляется полимеразами неизвестной природы, возможно, одна из них – репликативного типа. В третьей, постсинаптической, фазе репарации образовавшиеся структуры Холидея разделяются при участии особого фермента – резольвазы. В клетках бактерий и дрожжей подтверждено присутствие резольваз, однако, в клетках млекопитающих их обнаружить не удалось. Предположительно, ГР в данном случае завершается при участии комплекса топоизомеразы TopIIIa с хелперным белком BLAP75, а также при участи белков SOS-системы репарации (RecN, UvrD, RecF и RecJ) [West, 2003].

При негомологичном соединении концов нуклеотиды, оказавшиеся на концах разорванных цепей, могут быть утеряны, что происходит довольно часто. В свою очередь, гомологичная рекомбинация осуществляется при участии комплементарной цепи, что обеспечивает полное восстановление генетического материала. Таким образом, ГР обеспечивает более качественную репарацию двунитевых разрывов ДНК и её более высокую эффективность, нежели НСК.

Гомологичная рекомбинация охватывает ряд взаимосвязанных путей, которые функционируют при восстановлении двухцепочечных разрывов ДНК. Кроме того, ГР обеспечивает поддержку репликации ДНК при восстановлении повреждённых и остановившихся репликационных вилок. Центральные белки, особенно RAD51, катализируют ключевые реакции, характерные для гомологичной рекомбинации: поиск гомологов и внедрение цепи ДНК. Невозможность устранить повреждение ДНК и уменьшить репликативный стресс приводит к геномной нестабильности и способствует развитию заболеваний онкологической этиологии. Так, мутации в гене *BRCA2* (ген «общего контроля», супрессор опухолевого роста) вызывают предрасположенность к раку молочной железы и яичников, а также анемию Фанкони, для которой характерно наличие неопластических процессов [Li, Heyer, 2008].

1.2.4 Регуляция клеточного цикла и апоптоз

Когда клетки подвергаются воздействию ионизирующего излучения, они инициируют сложный ответ, который включает остановку прогрессирования клеточного цикла в фазах G_1 и G_2, апоптоз. Повреждение ДНК преобразуется во внутриклеточные сигналы для остановки клеточного цикла следующим образом. Мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок (ATM) и/или ДНК-зависимая протеинкиназа, которые активируются повреждением ДНК, могут инициировать остановку клеточного цикла путем активации белка-супрессора опухоли p53. Белок p53 действует как фактор транскрипции и регулирует

экспрессию нескольких компонентов, участвующих в путях, которые определяют прогрессирование клеточного цикла. Самый известный белок — p21WAF1/CIP1 — является ингибитором циклин-зависимых киназ, семейства протеинкиназ, известных как ключевые регуляторы клеточного цикла. Было показано, что p21WAF1/CIP1 способен ингибировать несколько циклин-зависимых киназ. Другие ингибиторы — CDK, p27KIP1 и p15INK4b — активируются облучением и способствуют остановке клеточного цикла в точке G_1/S. Радиационно-индуцированная остановка в точке G_2/M требует ингибирующего фосфорилирования киназы cdc2 через ATM-зависимый путь. Мутации в генах регуляции клеточного цикла распространены при раке человека, и регуляторный дефицит клеточного цикла может привести к повышению устойчивости к ионизирующей радиации в раковых клетках. Основной функцией p53-зависимой остановки в фазе G_1 может быть устранение клеток, содержащих повреждение ДНК, тогда как было показано, что остановка в фазе G_2 после облучения играет важную роль в защите клеток от гибели. Контрольные точки клеточного цикла предлагают новый набор потенциальных мишеней для химиотерапевтических соединений, особенно контрольную точку G_2/M. Также было обнаружено, что остановка цикла в контрольной точке G_2/M метилксантинами, такими как стауроспорин и UCN-01 (7-гидроксистауроспорин), повышает чувствительность клеток к ионизирующему излучению [[Wang, 2014]].

Остановка цикла в любой из контрольных точек сопровождается попыткой клетки по возможности восстановить повреждённую структуру ДНК. Если повреждение критическое или их очень много и восстановить ДНК до исходного состояния невозможно, в клетке начинается процесс запрограммированной смерти – апоптоз [Campisi, Cummings, 2014].

1.2.5 Иммунный ответ

Говоря об особенностях ответа иммунной системы на облучение важно учитывать, что в данном случае наблюдается обоюдный эффект: с одной стороны, иммунные реакции являются важным этапом защиты организма от радиации. Однако, с другой стороны, сама иммунная система подвергается повреждающему действию ионизирующего излучения [Ярилин, 1997].

Клетки, в которых завершился процесс апоптоза, необходимо утилизировать с минимальным причинением вреда организму. Для этого необходимо задействовать клеточный иммунитет. Так, воздействие ИИ обуславливает наличие вторичной

цитотоксичности, а именно — устранение апоптотических клеток иммунной системой [Marková et al., 2015].

В уничтожении апоптотических клеток ключевую роль играют макрофаги. Макрофаги являются завершающей стадией дифференцировки моноцитов. Они обладают выраженной фагоцитарной и провоспалительной активностью, участвуя в острых воспалительных процессах, однако могут проявлять и противовоспалительное действие за счет трансформирующего фактора роста β (TGFβ), например, в присутствии глюкокортикоидных гормонов [Chaplin, 2010].

Макрофаги — специализированные фагоциты апоптотических клеток. На гистологических препаратах клетки, в которых идёт процесс апоптоза, всегда колокализованы с макрофагами. Согласно исследованиям, макрофаги в основном включаются в процесс деградации апоптотических клеток и уничтожения их остатков на поздних стадиях апоптоза, в то время как на более ранних стадиях клетки, подвергающиеся апоптозу, фагоцитируются соседними клетками. Благодаря исследованиям *in vitro* было установлено, что мембрана фагоцитов несёт широкий спектр рецепторов, необходимых для взаимодействия с подвергшимися апоптозу клетками: интегрины, иммуноглобулины (IgSF), рецепторы для комплемента (CD91/кальретикулин) и так далее. На мембранах апоптотических клеток обнаружено гораздо меньше подобных структур, но они охватывают липидные, углеводные и белковые фрагменты, наиболее известными из которых являются экспонированный анионный фосфолипид — фосфатидилсерин. Также характерно большое разнообразие промежуточных молекулярных факторов, роль которых заключается в опсонизации апоптотических клеток и создании молекулярных мостиков между компонентами поверхностей апоптотических клеток и фагоцитов. Например, первый компонент комплемента — C1q — связывает поверхность апоптотических клеток с рецепторным комплексом фагоцитов CD91/кальретикулин. Такое взаимодействие обеспечивает высокую эффективность фагоцитоза [[Gregory, Devitt, 2004]].

Фагоциты или антигенпрезентирующие клетки распознают фагосомное содержание апоптотических клеток с помощью сигнального пути TLR. Вовлечение TLR существенно ускоряет скорость фагоцитоза, что достигается благодаря повышению эффективности слияния фагосом с лизосомами. В отсутствие передачи сигналов TLR или во время фагоцитоза апоптотических клеток *in vitro* созревание фагосом задерживается, а антигены, полученные из апоптотических клеток, не эффективно генерируют лиганды [Campisi, Cummings, 2014].

Экспериментальные данные и клинические наблюдения указывают на то, что лучевая терапия имеет потенциал для преодоления опухолевой иммуносупрессии.

Исследования, проведённые в модельных системах, показали, что лучевая терапия индуцирует перекрестное праймирование Т-клеток к опухолевым антигенам, в результате чего Т-клетки становятся способными к терапевтическому эффекту. Этому способствует радиационно-индуцированная модуляция хемокинов и молекул плазматической мембраны, которые усиливают рекрутирование Т-клеток и их взаимодействие с опухолевыми клетками [Vanpouille-Box et al., 2015].

Таким образом, все вышеописанные системы так или иначе направлены на сохранение исходной, неповреждённой структуры ДНК, или же, в крайнем случае, — на уничтожение клеток, в которых произошли необратимые изменения, затронувшие наследственный материал. Отсюда можно сделать вывод, что ключевым условием, определяющим радиочувствительность, является стабильность генома, в то время как важнейшим процессом, поддерживающим её, является репарация ДНК [Nickoloff et al., 2017]. Таким образом, ионизирующие излучения существенным образом влияют на иммунную систему, вызывая широкий спектр ее реакций – от изменения регуляции иммунного ответа до гибели иммуннокомпетентных клеток. Так, изменение экспрессии молекул адгезии, приводя к нарушениям распределения лимфоцитов, искажает пространственную организацию иммунной системы. Ее временная организация нарушается вследствие повреждения эпителия тимуса и связанного с этим «перевода иммунологических часов» в сторону старения [Ito, 1999]. Примером искажения внутренней структуры иммунной системы является нарушение баланса Th1/ Th2, и, как следствие, дисрегуляция клеточных и гуморальных механизмов иммунного ответа. Вмешиваясь в процесс селекции клонов лимфоцитов, облучение влияет на главную функцию иммунной системы – распознавание «своего» и «чужого» и дискриминацию последнего. Наконец, вмешательство в систему цитокиновой регуляции формирования и функционирования иммунитета, как и изменение под влиянием облучения выработки клетками иммунной системы антитканевых антител, обусловливает новый, измененный характер ее взаимодействия с другими регуляторными системами организма, прежде всего с нервной и эндокринной [Tru et al., 2007].

Таким образом, совокупность всех эффекторных процессов репарации ДНК, составляющих единый ответ клетки на воздействие ионизирующего излучения — жизненно необходимый и, вместе с тем, — сложнорегулируемый процесс. На него оказывает влияние множество факторов, в том числе — факторы транскрипции, которые активируются непосредственно при воздействии ионизирующего излучения или при помощи сигнальных путей, которые запускаются в ответ на облучение [Malewicz, Perlmann, 2014].

1.3 Вне- и внутриклеточный сигналинг

Воздействие радиации активирует различные сигнальные пути. Среди них наиболее важными являются следующие: MAPK-путь [Yu, 2012], путь тирозинкиназы Src [Dittmann et al., 2009], Hsp90-путь [Stankova et al., 2015], путь TGF-бета [Dancea et al., 2009]. Как правило, сигнальные пути заканчиваются в ядре на определенных транскрипционных факторах, которые индуцируют изменения экспрессии множества генов. В число ключевых транскрипционных факторов, активируемых при воздействии ионизирующего излучения, входят NF-κB и AP-1 [Criswell et al., 2003].

Src представляет собой тирозинкиназу, которая играет ключевую роль в процессах клеточного роста, деления, миграции и выживания. Src содержит следующие домены: уникальный домен, SH3-домен, домен SH2, домен белка-тирозинкиназы и регуляторный концевой домен. Главные сайты фосфорилирования Src включают активирующий pTyr419-сайт, который фосфорилируется в киназном домене смежной молекулой Src, и ингибирующий pTyr530-сайт в регуляторном концевом домене, который фосфорилируется С-терминальной Src-киназой (Csk) или Chk (Csk-гомологичная киназа) [Roskoski, 2015].

Весомые доказательства позволяют говорить о роли Src в развитии раковых заболеваний. В клетках Src переходит из неактивного состояния в активное с помощью множества механизмов, которые одновременно снимают ограничения на киназные и белок-взаимодействующие Src-гомологичные домены. В результате Src транслоцируется на периферию клетки, где, посредством присоединения гидрофобной группы, прикрепляется к внутренней поверхности плазматической мембраны. На этих периферийных сайтах каталитическая активность Src инициирует внутриклеточные пути передачи сигнала, которые влияют на рост клеток и их адгезию, внося, таким образом, вклад в контроль миграции клеток. Поэтому регуляция Src в раковых клетках может способствовать росту опухоли, а также стимулировать миграционный или инвазивный потенциал в клетках, которые без такой регуляции были бы относительно неподвижны. Имеются данные о том, что Src может также влиять на клеточную выживаемость и гибель клетки, которая бывает неизбежна при многих биологических процессах. Таким образом, Src-регуляция в раковых клетках может влиять на клеточный ответ, который часто нарушается при злокачественном процессе [Frame, 2002].

Показано, что при воздействии ионизирующего излучения в клетках происходит Src-зависимая активация P38 сигнального пути, относящегося к путям MAPK, в результате чего фосфорилируется RAC-альфа серин/треонин-протеин киназа (Akt) — внутриклеточный

фермент, выступающий в роли онкогена. При этом ингибирование p38-MAPK эффективно повышало чувствительность к радиации [Kim et al., 2008].

Установлено, что ингибитор Src-киназы фосфатаза 2 (PP2) повышает радиочувствительность, в частности, в клеточных линиях глиомы человека [Eom et al., 2016].

Радиационно-индуцированная активация Src была исследована в клеточной линии бронхиальной карциномы A549. Авторами исследования была показана связь между радиационно-индуцированной активацией Src и повышенным фосфорилированием рецептора эпидермального фактора роста [Dittmann et al., 2009].

Белок теплового шока 90 (Hsp90) является высококонсервативным молекулярным шапероном, участвующим в фолдинге, сборке, стабилизации и активации многочисленных белков. Данный белок также обнаруживается во внеклеточном пространстве, особенно в моделях опухолей *in vitro*. Хотя внеклеточное действие Hsp90 недостаточно четко установлено, согласно некоторым исследованиям, нацеленное воздействие на данный белок ослабляет инвазию опухолей и распространение метастаз, подтверждая его уникальную роль в прогрессировании опухоли. На сегодняшний день есть доказательства новой функции Hsp90 – содействие стволовым клеткам рака простаты путём регуляции стволовых маркеров, стимулирующих самообновление и способствующих росту опухоли [Nolan et al., 2016].

Белок Hsp90 также может способствовать выживанию клеток благодаря своей антиапоптотической активности, которая связана с его влиянием на путь NF-κB. Фактор NF-κB при участии Hsp90 и ещё одного шаперона — Cdc37 способствуют правильному сворачиванию белковых комплексов IκB киназы (IKK) и RAC-альфа серин/треонин-протеин киназы (Akt), каждая из которых усиливает диссоциацию ингибиторного белка I-κB от NF-κB и впоследствии усиливает его активность. Помимо этого, Hsp90 ингибирует дефосфорилирование Akt для стимуляции роста клеток и может оказывать влияние на процесс апоптоза, ингибируя олигомеризацию Apaf-1, тем самым предотвращая образование комплекса апоптосом и, следовательно, предотвращая активацию каспазы [Guttmann, Koumenis, 2011].

Согласно исследованиям, экспрессия гена белка Hsp90 снижается через 5,5 недель после воздействия радиации. Это довольно неожиданный результат, так как радиационное повреждение приводит к клеточному стрессу, в том числе — стрессу, вызванному радиационно-индуцированным повреждением белков. Шаперон Hsp90 работает как стабилизатор структуры белков, поэтому можно было ожидать, напротив, повышения уровня экспрессии кодирующего его гена. Таким образом, ингибирование Hsp90 приводит

к увеличению числа радиационно-индуцированных повреждений. Краткосрочный эффект воздействия ИИ существенно отличается от долгосрочного: по прошествии небольшого времени после облучения уровень экспрессии гена, кодирующего белок Hsp90, наоборот возрастает. Также повышается уровень экспрессии фактора транскрипции AP-1, что говорит о регуляции экспрессии Hsp90 данным транскрипционным фактором [Haase et al., 2014]. Установлено, что ингибирование Hsp90 гелданамицином способствует адаптивной защите и модифицирует радиационно-индуцированный ответ клеток крови человека на ранних стадиях [Stankova et al., 2015].

Фактор транскрипции AP-1 состоит из различных димерных комплексов, содержащих белки семейств Jun (c-Jun, JunB и JunD) и Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2), которые могут выполнять различные функции. В зависимости от полипептидного состава димера и последовательности-мишени AP-1 связывается с различным сродством с AP-1-сайтом в промоторе, тем самым регулируя экспрессию генов-мишеней с различной степенью эффективности [Christmann, Kaina, 2013]. Jun-белки образуют димеры друг с другом, в то время как Fos-белки не могут димеризоваться подобным образом, однако образуют гетеродимеры с Jun-белками, значительно повышая их эффективность связывания с ДНК и, как следствие, — транскрипционную активность. Из этого следует, что именно Fos-белки являются модуляторами транскрипционной активности фактора AP-1. Связывание Jun/Fos происходит, главным образом, на сайтах гептамера (TGAGTCA) [Ryseck, Bravo, 1991].

Активация AP-1 в основном зависит от действия сигнального пути MAPK и достигается посредством повышения экспрессии компонентов данного фактора. Начало каскада MAPK провоцируется либо активированными рецепторами фактора роста (таких как, например, эпидермальный фактор роста), либо повреждением ДНК. В итоге происходит ATM-зависимая активация JNK и ATR-зависимая активация p38-киназы. Активированная JNK фосфорилирует N-концевой домен c-Jun, который является активаторным. Таким образом, стимулируется связывание AP-1 с ДНК и повышается транскрипционная активность димера. Некоторые гены репарации ДНК были идентифицированы как мишени подобного механизма ответа на повреждение ДНК, так как содержат один или несколько функциональных сайтов связывания AP-1 в их промоторе [Christmann, Kaina, 2013].

Активные формы кислорода и другие свободные радикалы, возникающие в результате действия радиации, могут стимулировать активность AP-1, следовательно, оказывают влияние на прогрессирование клеточного цикла и индукцию апоптоза. Кроме того, радиационно-индуцированная активация AP-1 также коррелирует с повышением уровня глутамилцистеинсинтетазы, что напрямую связано с синтезом глутатиона.

Следовательно, AP-1 может быть применим в лучевой терапии с высокими дозами, так как способствует усилению клеточной защиты от АФК и регуляции клеточного апоптического ответа на облучение [Hellweg et al., 2016].

Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что фактор AP-1 повышает радиоустойчивость клеток рака предстательной железы, опосредуя сигналы от рецептора эпидермального фактора роста и внутриклеточного сигнального пути PI3K/AKT/mTOR [Kajanne et al., 2009].

NF-κB является ключевым транскрипционным фактором, который активируется в клетках в ответ на воздействие ионизирующего излучения. Показано, что дозы 2 Гр достаточно для активации NF-κB в линии миелоидных клеток человека KG-1, при диапазоне доз 5 – 20 Гр и времени пика около 2–4 ч после облучения [Criswell et al., 2003]. Фактор NF-κB (Nuclear factor-κB) предствляет собой семейство факторов транскрипции, которые играют важную роль в воспалительном процессе, иммунных реакциях, а также пролиферации и дифференцировке клеток, тем самым оказывая влияние на их жизнеспособность. Активация этого фактора происходит в результате протеосомной деградации белков, ингибирующих NF-κB (IκB), которая, в свою очередь, вызывается фосфорилированием. В нестимулированных клетках эти ингибиторы сохраняют димеры NF-κB в цитоплазме неактивными.

Большинство разнообразных сигнальных путей, приводящих к активации NF-κB, сходятся на комплексе IκB киназы (IKK), которая отвечает за фосфорилирование ингибиторных белков (IκB) и имеет важное значение для передачи сигнала. Дополнительное регулирование активности фактора NF-κB достигается за счет различных посттрансляционных модификаций основных компонентов сигнальных путей NF-κB (Рисунок 3). Помимо цитоплазматических модификаций белков IKK и IκB, а также других медиаторов, специфичных для данного сигнального пути, факторы транскрипции сами по себе могут подвергаться серьёзным модификациям. За последние два десятилетия был достигнут значительный прогресс в распутывании сложных сетей регуляции, которые контролируют ответ NF-κB. В итоге это привело к тому, что сигнальный путь NF-κB стал парадигмой для понимания общих принципов проведения сигналов и регуляции транскрипции генов [Oeckinghaus, Ghosh, 2009].

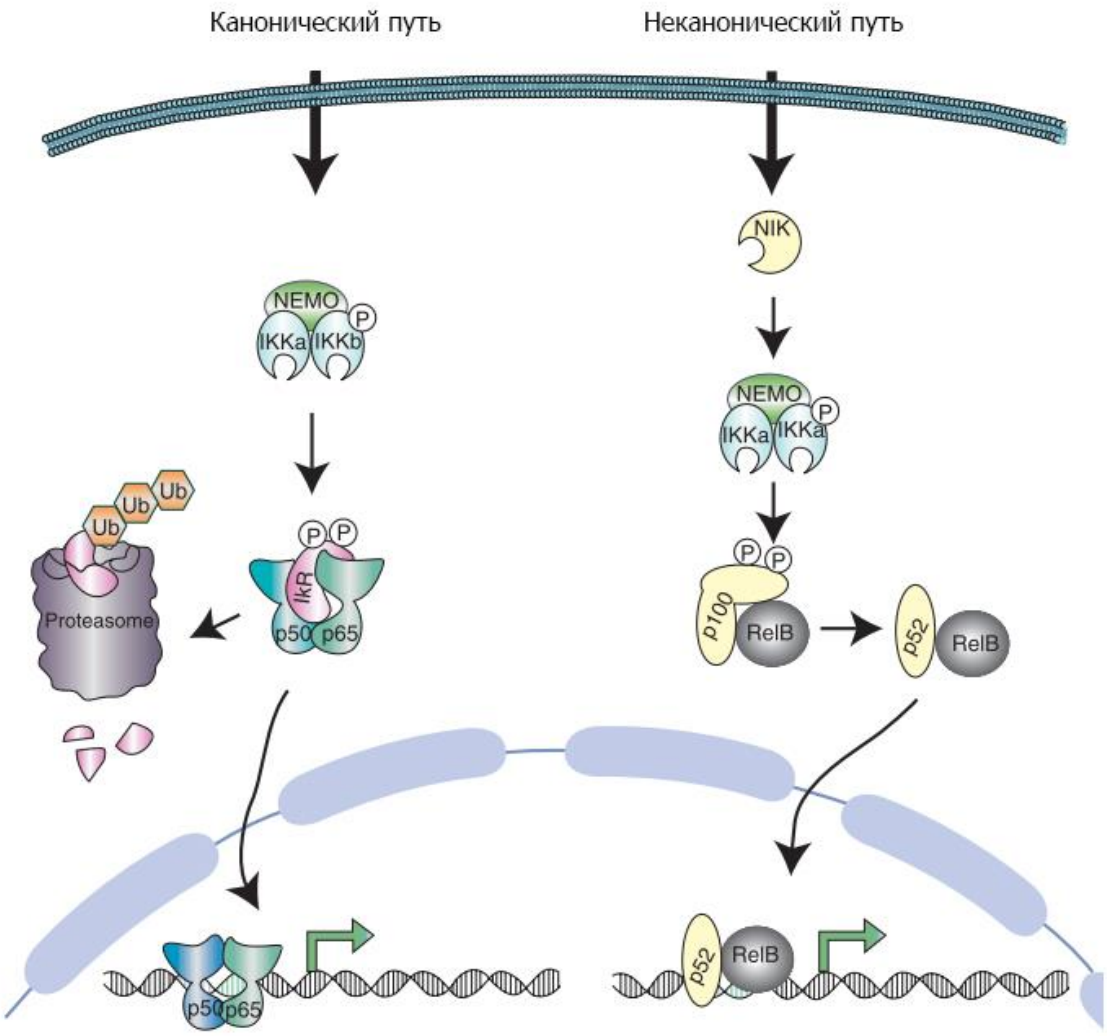

Рисунок 3 — Канонический и неканонический пути передачи сигналов с помощью фактора NF-κB (по Oeckinghaus, Ghosh, 2009)

Повышенная активность NF-κB при некоторых видах рака связана с устойчивостью опухоли к облучению. Блокирование активации NF-κB увеличивает апоптотический ответ и снижает рост и клональную выживаемость некоторых линий раковых клеток человека, хотя не все эксперименты показывают повышенную радиочувствительность за счет ингибирования NF-κB. Сообщается, что ингибирование NF-κB блокирует адаптивную радиорезистентность. Клетки рака молочной железы человека, подвергнутые фракционному γ-облучению, наряду с повышенной клональной выживаемостью демонстрируют активацию NF-κB. Эти результаты являются первым доказательством того, что активация NF-κB необходима для обеспечения сигналинга при радиоадаптивном ответе. Учитывая, что NF-κB, вероятно, способен регулировать более 150 эффекторных генов, эти результаты свидетельствуют о том, что NF-κB играет ключевую роль в

радиоадаптивной устойчивости опухоли под фракционным ионизирующим излучением [Li, 2008].

Сигнальные пути MAPK — группа многофункциональных внутриклеточных сигнальных путей, контролирующих транскрипцию генов, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз, реакции метаболизма и другие процессы. Данные сигнальные пути высококонсервативны [Yang et al., 2013]. Характерная особенность — наличие ключевого трёхкомпонентного модуля, состоящего из трёх митоген-активируемых протеинкиназ [Chen, Thorner, 2007]. Активация путей происходит при участии внеклеточных сигналов, например — гормонов или факторов роста, и опосредуется рецепторами, связанными с тирозинкиназами или G-белками. Рецепторы активируют ГТФазы, передающие сигнал на протеинкиназный модуль, состоящий из киназы киназы митоген-активируемой киназы (MAPKKK), которая фосфорилирует киназу митоген-активируемой киназы (MAPKK), которая, в свою очередь, фосфорилирует митоген-активируемую киназу (MAPK). Митоген-активируемая киназа фосфорилирует белки-мишени по остаткам серина и треонина, таким образом, передавая сигнал дальше. Кроме киназ, в состав сигнальных путей входят протеинфосфатазы и белки, которые обеспечивают сборку белковых комплексов [Mendoza et al., 2011].

Воздействие на клетки ионизирующим излучением приводит к компенсаторной активации нескольких путей MAPK. Эти сигналы играют значимую роль в контроле выживаемости клеток после облучения в зависимости от типа клеток. Один из сигнальных путей, активируемых после облучения, — это канонический путь MAPK (также известный как путь ERK). Другие пути MAPK, активируемые излучением, включают те, которые опосредуются рецепторами смерти и прокаспазами, а также сигналами повреждения ДНК. Это пути JNK и P38. В каноническом пути Ras-ГТФазы активируют киназу киназы MAPK/ERK, состоящую из белков семейства Raf (Raf-1, A-Raf и B-Raf), что приводит к запуску киназного каскада и передаче сигнала в ядро, где индуцируется экспрессия генов факторов транскрипции c-Fos и c-Myc. Путь JNK регулирует фактор транскрипции c-JUN. Данный путь часто называют «путь стресс-активированной протеинкиназы». Путь P38 активирует такие транскрипционные факторы, как CREB, однако при радиационной активации, скорее всего, CREB активируется каноническим путём. Основная функция пути P38 – обеспечение клеточного ответа на изменение осмолярности, однако, было показано, что данный путь влияет на рост и выживаемость клеток. Важно отметить, что способность ионизирующего излучения регулировать активность P38 сильно варьирует в разных группах: активации либо нет совсем, либо активация слабая, либо — сильная. В то же время при действии классического пути и JNK радиационно-индуцированная активация

наблюдалась во многих группах в различных типах клеток и в ответ на низкие и высокие дозы облучения. Таким образом, пути MAPK могут определять судьбу клетки после облучения. Сигнализация посредством ERK может снижать или повышать радиационную чувствительность в зависимости от типа клетки. Путь P38 играет важную роль в контроле радиационно-индуцированной остановки цикла в точке G2/M, которая является защитным, а в некоторых типах клеток — проапоптотическим эффектом. Активация пути JNK связана с токсическим эффектом облучения: исследования показывают связь передачи сигналов JNK с повышением экспрессии генов репарации ДНК [Dent et al., 2003]. Согласно исследованиям, действие сигнальных путей MAPK оказывает влияние на радиочувствительность опухолевых клеток из-за особенностей их ответа на радиационно-индуцированные повреждения ДНК [Munshi, Ramesh, 2013].

Белки суперсемейства трансформирующих факторов роста участвуют во многих клеточных процессах, включая ингибирование роста, миграцию клеток, инвазию, эпителиально-мезенхимальный переход, ремоделирование внеклеточного матрикса и иммуносупрессию. Однако, хотя в норме они динамически регулируются и участвуют в поддержании гомеостаза ткани, при патологических состояниях, таких, как рак, воспаление или фиброз, ген TGF-β характеризуются повышенной экспрессией. Избыточная экспрессия TGF-β стимулирует прогрессирование заболевания путем влияния на клеточный рост, миграцию или другое изменение фенотипа. Поэтому сигнальный путь TGF-β стал популярной мишенью для разработки лекарств [Bouquet et al., 2011].

TGF-β демонстрирует как подавляющие опухоль эффекты, которые злокачественные клетки должны преодолеть для продолжения своего развития, так и онкогенные эффекты, стимулирующие пролиферацию и инвазию клеток после ингибирования активности супрессора. TGF-β регулирует такие процессы, как иммунная регуляция и клеточная инвазия, а также модификация микроокружения, которые могут стимулировать развитие злокачественных клеток. Общепризнано, что на ранних стадиях TGF-β играет важную роль в подавлении злокачественных образований. TGF-β также является важным модулятором иммунитета, в частности, злокачественные клетки, которые избегают подавляющих рост эффектов, способны продуцировать большие количества этого цитокина и, таким образом, ускользать от иммунного ответа. В нормальных или предраковых клетках TGF-β ингибирует прогрессирование опухоли непосредственно через клеточно-автономные эффекты подавления опухоли (цитостаз, дифференцировка, апоптоз) или косвенно через его воздействие на строму (подавление воспаления и митогенов, полученных из стромы). Когда функция подавления роста теряется в злокачественных клетках, путь TGF-β используется для инициации уклонения от иммунитета, для

продуцирования факторов роста, для дифференциации в более инвазивный фенотип и облегчения распространения, приводящего к метастазированию. Кроме того, связывание TGF-β с его рецептором активирует многие неканонические сигнальные пути, что в итоге приводит к повышению устойчивости к воздействию радиации [Dancea et al., 2009].

Белок TGF-β вносит вклад в формирование радиорезистентности клеток. Линии клеток рака молочной железы человека, предварительно обработанные низкомолекулярным ингибитором TGF-β, показывали повышение радиочувствительности. Помимо пониженной клональной выживаемости при ингибировании TGF-β наблюдалось снижение радиационно-индуцированного фосфорилирования белков H2AX и p53. Кроме того, нейтрализующие TGF-β антитела повышали радиационную чувствительность, блокировали образование фокусов γH2AX и значительно увеличивали задержку роста опухоли в ответ на единичное и фракционированное облучение [Bouquet et al., 2011].

Изменение экспрессии гена *TGFB1* связано с клеточным ответом на воздействие радиации. Экспрессия повышается спустя 2 часа и 6 часов после воздействия ИИ. Промотор *TGFB1* содержит сайты связывания с транскрипционным фактором AP-1. Это свидетельствует о том, что стресс-индуцируемое повышение экспрессии *TGFB1* опосредуется активацией фактора транскрипции AP-1 [Martin et al., 1997].

Также показано, что активность TGF-β является основным препятствием, не позволяющим лучевой терапии эффективно индуцировать выработку Т-лимфоцитами высокоспецифичных к опухоли антител. TGF-β является мощным иммуноподавляющим цитокином, который препятствует перекрестному праймированию Т-клеток путем нарушения антиген-презентирующей функции дендритных клеток [Vanpouille-box et al., 2016].

На работу сигнальных путей оказывают влияние белки и белковые комплексы, содержащиеся в межклеточном матриксе, в частности — протеазы, изменяющие структуру сигнальных молекул. Протеазы межклеточного матрикса осуществляют точное регулирование величины, продолжительности и пространственных аспектов передачи сигналов различных путей межклеточной сигнализации путём взаимодействия с рецепторами, локализованными на мембранах клеток. Рецепторы, активируемые протеазой (PAR), являющиеся одной из групп связанных с G-белками рецепторов (GPCR), контролируют множество физиологических реакций, обеспечивая пространственную и временную точность передачи сигналов. Воздействие на рецепторы осуществляется посредством протеолитического расщепления внеклеточного N-концевого домена PAR в определенных сайтах, что приводит к запуску внутриклеточной передачи сигналов [Soh et al., 2010]. Таким образом, протеазы межклеточного матрикса могут принимать

участие в радиационно-индуцированном ответе, опосредуя функционирование межклеточных путей сигнализации.

Так, на примере эндотелия бычьей аорты показано, что чувствительность клеток к облучению *in vitro* значительно зависит от условий микроокружения, в которых проводится эксперимент. Облученные клетки культивировали на пластиковой поверхности стандартных чашек для культивирования и на поверхности, на которую предварительно была нанесена близкая к естественной базальной мембране матрица. Во втором случае клетки демонстрировали значительно более высокую выживаемость [Fuks et al., 1992].

Продуктом гена *ADAMTS1* является одноимённый многодоменный белок внеклеточного матрикса (дезинтегрин и металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1). Данный белок играет важную роль в морфогенезе тканей, а также в патофизиологическом и воспалительном процессах. В основном *ADAMTS1* экспрессируется в яичниках, плаценте, матке, клетках бронхиального эпителия, адренокортексе, гладких мышцах, адипоцитах и фибробластах. При инактивации гена наблюдаются замедление роста, аномалии жировой ткани, снижение плодовитости с дефектами развития фолликулов при овуляции, тяжёлые аномалии почек, замедленное заживление ран [Kelwick et al., 2015].

Новые исследования выявили несколько особенностей функционирования данной металлопротеиназы. Было установлено, что экспрессия *ADAMTS1* не сильно выражена в нормальных тканях, не характеризующихся течением патологических процессов. Однако стимуляция, как, например, воспаление и гипоксия (в эндотелиальных клетках), индуцирует экспрессию *ADAMTS1*. Так, повышенный уровень экспрессии *ADAMTS1* наблюдался у пациентов с острым инфарктом миокарда. Помимо этого, было обнаружено, что *ADAMTS1* играет важную роль в ангиогенезе и лимфангиогенезе и эти функции не связаны с его протеазной активностью [Hirohata et al., 2017].

На сегодняшний день имеются подтверждения того, что продукт гена *ADAMTS1* задействован в процессе канцерогенеза. Так, экспрессия *ADAMTS1* оказалась снижена в опухоли молочной железы человека, а нокаут *ADAMTS1* стимулировал миграцию, инвазию и формирование инвадуподий в клетках рака молочной железы *in vitro*. Возможно, данные эффекты продукта *ADAMTS1* опосредованы действием VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) [Freitas et al., 2013]. Для *ADAMTS1* было описано антиангиогенное действие и участие в предотвращении опухолевого роста. Повышение экспрессии данного гена привело к полному ингибированию роста опухоли. Объяснить такой механизм можно протеолитической активностью, направленной на нидогены – белки, входящие в состав базальной мембраны. Повышенная экспрессия *ADAMTS1* сопровождается более активным протеолизом нидогенов 1 и 2 и их почти полным удалением в базальной мембране сосудов,

что приводит к морфологическим изменениям кровеносных сосудов опухоли и уменьшению их плотности [Martino-Echarri et al., 2013]. Установлено, что уровень метилирования гена *ADAMTS1* связан с раком поджелудочной железы — чем выше уровень метилирования, тем выше риск возникновения данного заболевания. Кроме того, *ADAMTS1*, вероятно, имеет уникальное значение в микроокружении опухоли [Eissa et al., 2019].

Все вышеописанные системы так или иначе направлены на сохранение исходной, неповреждённой структуры ДНК, или же, в крайнем случае, — на уничтожение клеток, в которых произошли необратимые изменения, затронувшие наследственный материал. Отсюда можно сделать вывод, что ключевым условием, определяющим радиочувствительность, является стабильность генома, в то время как важнейшим процессом, поддерживающим её, является репарация ДНК [Nickoloff et al., 2017]. Репарация, в свою очередь, регулируется системами внутри- и межклеточного сигналинга, частью которых являются металлопротеиназы межклеточного матрикса. Таким образом, продукт гена *ADAMTS1* (металлопротеиназа с мотивом тромбоспондина 1) оказывает влияние на процессы репарации ДНК и, как следствие, – участвует в радиационно-индуцированном клеточном ответе.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

В качестве материала использовали:

1. опухолевая клеточная линия карциномы шейки матки HeLa;
2. полученная на основе HeLa линия, нокаутная по гену *ADAMTS1*;

Клеточная линия HeLa была любезно предоставлена М. А. Булдаковым (НИИ онкологии Томского НИМЦ).

2.2 Схема эксперимента

Для оценки влияния нокаута и сверхэкспрессии изучаемого гена на радиационно-индуцированный ответ в клетках необходимо определить изменения экспрессии генов, а также — клеточного фенотипа.

Изменения профиля экспрессии изучены посредством полнотранскриптомного анализа с помощью экспрессионных микрочипов клеточных линий с нокаутом гена *ADAMTS1* относительно исходной клеточной линии HeLa. Анализ проведен в клеточных линиях до облучения и через 30 минут после воздействия γ-излучения в дозе 2 Гр. Валидация результатов проведена методами количественной ПЦР в реальном времени. Кроме того, анализ изменения экспрессии выявленных дифференциально экспрессируемых генов был проведен в клетках и после сверхэкспрессии гена *ADAMTS1*.

Анализ фенотипических эффектов заключался в оценке частоты микроядер и клональной выживаемости. Оценка способности клеток к образованию колоний в исходной и нокаутной по гену *ADAMTS1* клеточных линиях HeLa проведена до и после облучения в дозе 2, 4, 6 и 8 Гр по стандартным расчётным формулам путём визуального подсчёта колоний, окрашенных красителем Гимза. Оценка частоты микроядер проведена до и после облучения в дозе 2 Гр с помощью микроядерного теста с флуоресцентной in situ гибридизацией.

Нокаутная клеточная линия сравнивалась с исходной линией HeLa для выявления эффекта нокаута. Также облучённые клетки сравнивались с необлучёнными для выявления эффекта воздействия радиации.

2.3 Обеспечение нокаута и сверхэкспрессии гена *ADAMTS1*

Нокаутная линия по гену *ADAMTS1* была получена с помощью системы CRISPR/Cas9 в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). В клетки исходной опухолевой линии HeLa были введены короткие делеции и инсерции, приводящие в большинстве случаев к возникновению стоп-кодонов и, как следствие, — укорочению продукта гена. Отсутствие функциональных доменов было предсказано in silico. Олигонуклеотиды, содержащие целевую последовательность sgRNA и липкие концы для встраивания в плазмиду, были синтезированы в ООО «Биоссет» (г. Новосибирск). Подбор последовательностей химерных направляющих РНК (sgRNA) на экзон 2 гена *ADAMTS1* проводился с помощью биоинформационного ресурса sgRNAScorer (https://crispr.med.harvard.edu/sgRNAScorer/). В качестве вектора для клонирования был использован gRNA cloning vector BsmBI. Олигонуклеотиды, соответствующие смысловой и антисмысловой цепям химерных направляющих РНК, клонировались в плазмидный вектор с помощью рестриктазы BsmBI (NEB, Англия).

Последовательность мутации была установлена с помощью таргетного секвенирования нового поколения на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием олигонуклеотидных праймеров и набора секвенирующих реагентов MiSeq Nano v2 (Illumina, США). Полученные риды картировались на исходную последовательность ампликонов на базе геномной сборки hg38.

Трансфекция двух плазмид с направляющими РНК и плазмиды с генами Cas9 и GFP (Addgene plasmid, 48138) осуществлялась с использованием Липофектамина 3000 (Thermo, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч после трансфекции GFP-позитивные клетки отбирались на клеточном сортере FACS культивировались в течение 2 недель для образования колоний. Анализ присутствия мутаций в сайте редактирования осуществлялся с помощью таргетного массового параллельного секвенирования. Амплификация участков экзона 2 гена *ADAMTS1* проводилась с помощью ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров. Приготовление библиотек проводилось с помощью набора Nextera XT (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование осуществлялось на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Nano Kit v2 kit (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Создание клеточной линии HeLa со сверхэкспрессией гена *ADAMTS1* осуществлялось с помощью временной ADAMTS1_pCSdest, содержащей кодирующую изучаемого гена, любезно предоставленной Roger Reeves (Addgene plasmid, 53807).

Трансфекция осуществлялась с помощью Липофектамина 3000 (Thermo, США) по протоколу производителя.

2.4 Культивирование и облучение клеточных линий

Клеточные линии культивировались в питательной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) при 37ºС в условиях 5% CO_2 в CO_2-инкубаторе (Panasonic, Япония) со сменой среды каждые 3 суток. Используемый антибиотик — эритромицин в концентрации 1 мкл/1 мл среды.

Для оценки клональной выживаемости культуры растили во флаконах Т-25 (TPP, Швейцария) в течение 2 пассажей до 70% площади покрытия, после чего производили пересев в 6-луночные планшеты (TPP, Швейцария) в количестве 6×10^5 клеток; концентрация клеточной суспензии — 3×10^5 клеток/мл. Было сделано 3 технических повторности для каждой линии и весь эксперимент был повторен в 3 повторностях.

Для анализа транскрипционных профилей было подготовлено 4 флакона Т-25 (TPP, Швейцария) — по 2 на каждую линию. Из них 2 (то есть по одному для каждой линии) не облучались, другие 2 были подвергнуты воздействию γ-излучения ^{60}Co в дозе 2 Гр. За сутки до проведения эксперимента с помощью камеры Горяева было подсчитано количество клеток для каждой линии, затем было осуществлено разведение клеточной суспензии до равных концентраций – 8×10^4 клеток на 1 мл клеточной суспензии.

Для оценки частоты микроядер для каждой клеточной линии также было подготовлено 4 флакона Т-25 (TPP, Швейцария) — по 2 флакона на линию. Из них 2 флакона подвергались облучению, другие 2 являлись контрольными. Концентрация клеточной суспензии во флаконах для оценки частоты микроядер составила $0{,}5\text{-}1 \times 10^6$ клеток на мл.

Воздействие ионизирующим излучением проводилось с помощью гамма-терапевтического аппарата Theratron Equinox (Best Theratronics, Канада) при комнатной температуре на базе Томского областного онкологического диспансера (мощность дозы – 0,63 Гр/мин). Транспортировка планшетов (для клональной выживаемости) и флаконов (для анализа профилей экспрессии и частоты микроядер) с культурами осуществлялась на льду. После облучения питательная среда заменялась на свежую.

2.5 Оценка клональной выживаемости

После облучения клетки рассаживались в трёх технических повторностях и инкубировались в течение двух недель. По истечении двухнедельного срока инкубации колонии фиксировались метанол-уксусным фиксатором (3:1) с последующим окрашиванием красителем Гимза (ПанЭко, Россия). Затем следовал подсчёт числа зафиксированных колоний. Число колоний оценивалось визуально, после чего по следующей формуле вычислялась эффективность посева (ЭП): ЭП = число колоний на 14 день / исходное число клеток × 100%. Клональная выживаемость (КВ) = число колоний на 14 день после облучения / исходное число посаженных клеток после облучения / эффективность посева × 100%.

2.6 Анализ частоты микроядер

После облучения флаконы с клеточными культурами были перенесены в CO_2-инкубатор на 24 часа при 37ºС. По истечении 24 часов клетки фиксировались с использованием метанол-уксусного фиксатора (3:1). Препараты были изготовлены путём раскапывания на предметные стекла 20 мкл полученной клеточной суспензии с последующим заключением в среду Vectashield, содержащую краситель DAPI (VectorLab, США), под покровные стекла. Частота микроядер оценивалась с помощью микроскопа Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия) с автоматической системой регистрации препаратов Metafer (Metasystems, Германия) при увеличении x630. Для каждой клеточной линии была оценена частота микроядер в 1000 облученных и 2000 необлученных клеток.

2.7 Полнотранскриптомный анализ

2.7.1 Выделение РНК

Выделение РНК как облучённых, так и контрольных образцов, производилось через 30 минут инкубации при 37 °C с момента смены среды. Среда удалялась, затем клетки промывались фосфатным буфером (1×PBS). Для лизиса культур к клеткам добавлялся реагент «ЛИРА» (Биолабмикс, Россия) в количестве 2,5 мл на флакон, с которым клетки инкубировались 15 минут. Далее процедура выделения РНК проводилась согласно стандартному протоколу производителя с некоторыми модификациями.

После добавления реагента для выделения РНК из клеток и тканей «ЛИРА» в каждую пробирку добавлялось по 250 мкл хлороформа (что составляет 1/5 от исходного объёма «ЛИРЫ» согласно протоколу производителя), пробирки инкубировались 10 минут. После центрифугирования (10 минут, 10000 g, +4ºС) из клеточной суспензии, разделившейся на нижнюю фазу, интерфазу и верхнюю (водную) фазу, половина верхней фазы переносилась в чистую пробирку. В неё добавлялись 3 М раствор ацетата натрия (1/10 объёма) и изопропанол, охлаждённый до -20ºС, в объёме, равном объёму перенесённой водной фазы. После инкубации (10 минут при -20ºС) и центрифугирования (10 минут, 12000 g, +4ºС) удалялся супернатант и к осадку добавлялся 80%-ный этанол, охлаждённый до -20ºС в объёме, в два раза превышающем объём перенесённой водной фазы. После центрифугирования (5 минут, 12000 g, +4ºС) промывание этанолом необходимо было повторить (модификация основного протокола). Полученный осадок высушивался в концентраторе Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Германия) в течение 2 минут, затем к нему добавлялась очищенная от РНКаз вода в количестве 40 мкл и 0,5 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Fisher Scientific, США). Выделенная РНК инкубировалась 10 минут, её количество определялось с помощью спектрофотометра Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Хранение РНК обеспечивалось при температуре -70ºС.

2.7.2 Очистка РНК

Очистка образцов РНК была произведена с применением набора реактивов RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) по стандартному протоколу производителя. Образец с выделенной РНК доводили до объема 100 мкл водой, очищенной от РНКаз, добавляли 350 мкл буфера RLT и тщательно пипетировали. Затем добавляли 250 мкл этанола (96-100%), переносили образец (700 мкл) в колонку, помещенную в пробирку (2 мл) и центрифугировали 15 с при 8000 g. После этого всю жидкость из пробирки удаляли. На следующем этапе в колонку с суспензией РНК добавляли 500 мкл буфера RPE и центрифугировали при тех же условиях. Затем вновь добавляли 500 мкл буфера RPE и центрифугировали 2 мин при 8000 g. Для очистки от этанола мембрану колонки тщательно высушивали путём центрифугирования в течение 1 мин. Колонку с суспензией РНК переносили в новую пробирку типа эппендорф (1,5 мл), добавляли 50 мкл воды, очищенной от РНКаз, на мембрану колонки, и центрифугировали 1 мин при 8000 g для элюции РНК.

2.7.3 Оценка качества РНК

Оценка качества выделенной и очищенной РНК была произведена с помощью биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США). Особенность данного метода заключается в автоматическом направленном разделении нуклеиновых кислот под действием электромагнитного поля. Детекция осуществляется посредством фотоэмиссии. Для оценки качества РНК использовали параметр RIN (RNA Integrity Number – показатель целостности РНК). Оценку качества РНК осуществляли по стандартному протоколу производителя. Анализ данных производили в программе 2100 Expert. Все образцы РНК имели RIN 9-10.

2.7.4 Введение флуоресцентной метки в образец РНК

Мечение образцов с одновременным получением кДНК осуществляли по протоколу, рекомендованному производителем (Agilent Technologies, США). Образцы РНК высушивали на концентраторе (Eppendorf, Германия) и разводили (для проведения последующих реакций) из расчета 1,5 мкл образца на 1 реакцию. В каждый образец добавляли по 2 мкл калибровочного раствора Spike Mix и 1,8 мкл T7 Primer Mix (0,8 мкл T7 Primer и 1 мкл деионизованной воды), после чего тщательно перемешали раствор на вортексе. Для денатурации РНК образцы инкубировали в термостате 10 мин при температуре 65 °С, после чего переносили на 20 °С и выдерживали в течение 5 мин. После инкубации, в каждую пробирку добавляли cDNA Master Mix объемом 4,7 мкл (2 мкл 5×First Strand Buffer + 1 мкл 0,1 M DTT + 0,5 мкл 10 mM dNTP Mix + 1,2 мкл Affinity Script RNase Block Mix) и тщательно перемешивали на вортексе. Инкубировали образцы в термостате при 40 °С в течение 2 ч, а затем выдерживали 15 мин при 70°С и 5 мин при 20 °С. Добавляли в каждую пробирку по 6 мкл Transcription Master Mix (0,75 мкл Nuclease-free water + 3,2 мкл 5×Transcription Buffer + 0,6 мкл 0,1 M DTT + 1 мкл NTP Mix + 0,21 мкл T7 RNA Polymerase Blend + 0,24 мкл Cyanine 3-CTP), аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 2 ч при 40 °С.

2.7.5 Очистка флуоресцентно-меченных образцов РНК

Очистку образцов от примесей проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) по стандартному, рекомендованному производителем протоколу. Для этого в каждый образец добавляли по 84 мкл деионизованной воды, 350 мкл лизирующего буфера

RLT и аккуратно перемешивали пипетированием. Затем раскапывали по 250 мкл 96% этилового спирта, перемешивали, добавляли 700 мкл раствора из набора и центрифугировали в течение 30 секунд на 13000 об./мин при 4 °С. Раскапывали по 500 мкл RPE буфера (с этанолом) и снова центрифугировали при тех же условиях, но в течение 1 мин. Удаляли супернатант, переносили колонку в новую 1,5 мл пробирку, добавляли 30 мкл деионизованной воды прямо на мембрану колонки, выдерживали 1 мин и центрифугировали на 13000 об./мин при 4 °С в течение 1 мин. После центрифугирования к суспензии добавляли 30 мкл деионизованной воды, инкубировали 1 мин и снова центрифугировали при тех же условиях.

2.7.6 Гибридизация меченых образцов РНК на микрочипах

Гибридизацию проводили на экспрессионных микрочипах Agilent v.3 (8×60K) по стандартному протоколу, рекомендованному производителем. Для этого готовилась гибридизационная смесь: 600 нг меченой ДНК + 5 мкл 10×Gene Expression Blocking Agent + вода (24 мкл) + 1 мкл 25× Fragmentation Buffer. Образцы последовательно инкубировали в течение 30 мин при 60 °С и в течение 1 мин при -20 °С. В каждый образец добавляли по 25 мкл гибридизационного буфера, аккуратно перемешивали и раскапывали на микрочипы в объеме 42 мкл. Затем осуществляли процесс инкубации в гибридизационной печи (Agilent Technologies, США) в течение 18 часов при ротации 10 об./мин, после чего образцы отмывали (в соответствии со стандартным протоколом) и сканировали с помощью сканера Agilent SureScan по протоколу AgilentG3_GX_1Color.

2.8 Количественная ПЦР в режиме реального времени

Проверка данных полнотранскриптомного анализа проводилась с помощью ПЦР в режиме реального времени. Для проведения реакции производили выделение, очистку и оценку качества РНК по протоколам, описанным выше.

Для проверки были выбраны гены, соответствующие критерию FDR < 0,05. Таким тестируемым геном являлся *SEPP1*, референсными генами — *HPRT1* и *RPS18*. Уровень экспрессии каждого целевого гена оценивали относительно уровня экспрессии референсных генов.

2.8.1 Разработка и проверка эффективности олигонуклеотидных праймеров

2.8.1.1 Подбор праймеров

Начальным этапом при подготовке к проведению ПЦР является подбор праймеров к целевому гену, а также выбор референсного гена и подбор праймеров к нему. В качестве референсных генов были выбраны гены *HPRT1* и *RPS18*. Ген *HPRT1* кодирует фермент гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу, который катализирует синтез монофосфата гуанозина из гуанина и синтез монофосфата инозина из гипоксантина. Этот фермент играет ключевую роль в синтезе пуриновых нуклеотидов. Мутации в данном гене приводят к синдрому Лёша-Нихена или подагре [Nguyen et al., 2017]. Ген *RPS18* кодирует субъединицу рибосомы S18, соответственно, является одним из важнейших составляющих клеточного аппарата трансляции [Ilin et al., 2011]. Данные гены наиболее предпочтительны для оценки экспрессии в клеточной линии HeLa, так как экспрессируются в этих клетках более стабильно, нежели традиционно использующиеся в ПЦР в качестве референсных гены *ACTB* и *GAPDH* [Krainova et al., 2013].

Подбор праймеров для проведения реакции осуществлялся с помощью инструмента Primer BLAST [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/]. Проверка на наличие димеров и шпилек осуществлялась с помощью программы Vector NTI Advance®11.5.4.

Характеристика праймеров представлена в Таблице 2.

Таблица 2 — Последовательности подобранных праймеров

Название	Последовательность (5'-3')	Длина продукта (п.н.)
HPRT1-F	GACCAGTCAACAGGGGACAT	132
HPRT1-R	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG	
RPS18-F	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	120
RPS18-R	GGCTAGGACCTGGCTGTATTT	
SEPP1-F	ACTGCTCTCTCACGACTCTC	97
SEPP1-R	TGGTAATGAGGCGATGGAGT	

При подборе праймеров учитывались следующие условия:

1) размер праймеров — 18-23, оптимум — 20 п.н.;

2) размер продукта — 70-120 п.н.;

3) температура плавления (Tm) — 58–60°C, максимальное различие между Tm двух праймеров — 2°C;

4) один из праймеров должен быть комплементарен стыку экзонов, имеющемуся в мРНК, но которого нет в ДНК;

5) содержание C/G — 40–60%;

Праймеры высокой степени очистки синтезировали в ООО «Биоссет» (Россия).

2.8.1.2 Обратная транскрипция

Для определения концентрации РНК использовали оптиковолоконный спектрофотометр NanoDrop ND-1000 (США). Оптимальное количество РНК в образце для проведения обратной транскрипции составило 5 мкг (согласно рекомендациям производителя набора реактивов для обратной транскрипции), A260/280 ≈ 1,8–2,0, A260/230>1. Соотношения A260/280 и A260/230 характеризуют оптическую плотность раствора при длинах волн 260 и 280, 260 и 230, соответственно. Если отношение A260/280 меньше 1,8, значит, образец загрязнен белками или фенолом. Если отношение A260/230 меньше 1 – образец загрязнен солями.

Процедура обратной транскрипции осуществлялась с помощью набора реактивов ОТ M-MuLV–RH (БиоЛабМикс, Россия) по протоколу, рекомендованному производителем [http://biolabmix.ru]. В состав рабочих смесей входили: РНК-матрица (до концентрации не более 5 мкг), олиго(dT) праймер (20 мкМ, 1 мкл), 5×реакционный ОТ-буфер KCl (4 мкл), дитиотреитол (0,1 М, 2 мкл), M-MuLV–RH ревертаза (100 ед./мкл, 1 мкл), смесь dNTP (10 мМ, 1 мкл), вода деионизированная (при необходимости – до общего объёма реакционной смеси 20 мкл).

РНК-матрицу и праймер аккуратно перемешивали в стерильной, свободной от нуклеаз пробирке, затем капли сбрасывали центрифугированием. Смесь прогревали 2-3 минуты при 70°С для расплавления вторичных структур, после чего помещали пробирку в лёд. В пробирку добавляли заранее приготовленную смесь следующего состава: буфер KCl, дитиотреитол, M-MuLV–RH ревертаза, смесь dNTP, после чего снова аккуратно перемешивали и сбрасывали капли при помощи центрифугирования. Реакционную смесь инкубировали 60 минут при 42°С. Реакцию останавливали нагревом реакционной смеси до 70°С в течении 10 минут.

2.8.1.3 Проверка эффективности праймеров и отработка условий проведения ПЦР

Отработка условий проведения ПЦР проводилась в два этапа. Первый этап проводился с целью убедиться, что выбранные праймеры будут давать целевые продукты

нужного количества и размера и не дадут неспецифических продуктов. На втором этапе определялось соответствие между концентрацией кДНК в рабочей ПЦР-смеси и циклом выхода продукта.

Для каждого этапа был составлен протокол с указанием заполнения лунок планшета и составом реакционной смеси. Для предотвращения контаминации образцов ДНК была проведена ультрафиолетовая обработка УФ-бокса, а также необходимых инструментов и реактивов. Сухие лиофилизированные праймеры были растворены в деионизованной воде до концентрации 100 мкмоль/л, а затем до 10 мкмоль/л, для получения рабочей концентрации растворов праймеров.

После раскапывания ПЦР-смеси планшет накрывался оптически прозрачной плёнкой (Bio-Rad, США) и центрифугировался в концентраторе Concentrator plus (Eppendorf, Германия) в течение 1 минуты со скоростью 1000 об/мин. ПЦР в режиме реального времени проводилась в амплификаторе AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies, США). Отжиг проводился в течение 7 минут при температуре 95 ºС (1 цикл), амплификация — 30 секунд при температуре 95 ºС и 45 секунд при температуре 60 ºС (45 циклов), элонгация — 30 секунд при температуре 95 ºС, 30 секунд при температуре 65 ºС, и 30 секунд при температуре 95 ºС (1 цикл).

На первом этапе в эппендорфе смешивалось из расчета на одну лунку: 1 мкл кДНК, 7,5 мкл деионизированной воды и 12,5 мкл смеси для количественного проведения ПЦР в режиме реального времени HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабМикс, Россия). Смесь осторожно перемешивалась и центрифугировалась с помощью центрифуги-вортекса Microspin FV-2400, (Biosan, Латвия). Затем в 96-луночный планшет в соответствии с протоколом раскапывались праймеры, специфичные к исследуемым генам (по 2 мкл прямого и обратного праймера в лунку), и приготовленная смесь (по 21 мкл в лунку).

По итогам данного этапа отбирались только те пары праймеров, которые не давали неспецифических продуктов. Число продуктов, синтезируемых с участием праймеров для каждого гена, определялось исходя из графиков плавления, получаемых в программе AriaMx (Agilent Technologies, США).

На втором этапе готовилось 4 смеси с различной концентрацией кДНК. Затем в соответствии с протоколом в 96-луночный планшет раскапывались праймеры и приготовленные смеси в том же порядке, что и при проведении первого этапа, причём на каждую концентрацию кДНК для каждой пары праймеров приходилось по три технических повторности. Затем планшет накрывался оптически прозрачной плёнкой (Bio-Rad, США) и центрифугировался в концентраторе Concentrator plus (Eppendorf, Германия) в течение 1 минуты со скоростью 1000 об/мин. Полимеразная цепная реакция в режиме реального

времени проводилась в амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США). По завершении отбирались те пары праймеров, у которых наблюдалось чёткое соответствие между циклом выхода продукта и концентрацией кДНК в ПЦР-смеси: увеличение концентрации кДНК в два раза должно было смещать цикл выхода на единицу влево. Анализ циклов выхода проводился с помощью программы AriaMx (Agilent Technologies, США).

2.8.1.4 Электрофорез в агарозном геле

Для выяснения молекулярной массы продуктов, образующихся в ходе ПЦР, проводился электрофорез ампликонов в агарозном геле. В качестве буфера для приготовления геля 3%-го геля (3 г агарозы на 100 мл буфера) использовался раствор 1×TAE. В качестве красящего агента применялся бромистый этидий, в качестве маркера длин фрагментов ДНК – маркер длин фрагментов ДНК 1-10 т.п.н. Электрофорез проводился при силе тока 55 мА в течение 50 минут. Визуализация была произведена с помощью гель-документирующей системы (Bio-Rad Laboratories, США).

2.8.2 Проведение ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени провели с использованием праймеров на ген *SEPP1* с целью валидации результатов полнотранскриптомного анализа.

В смесь для ПЦР включили 25 нг ДНК, 12,5 мкл смеси для количественного проведения ПЦР в реальном времени БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (2×) (БиоЛабМикс, Россия), по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров (1 мкмоль/л). Общий объем смеси довели водой, не содержащей РНКаз, до 25 мкл. Раскапали смесь в лунки в соответствии с протоколом проведения ПЦР. Планшет накрыли оптически прозрачной пленкой (Bio-Rad, США) и отцентрифугировали в концентраторе Concentrator plus (Eppendorf, Германия) в течение 1 минуты со скоростью 1000 об/мин.

Провели ПЦР в режиме реального времени в амплификаторе AriaMx (Agilent Technologies, США). После завершения реакции проанализировали графики накопления ДНК с помощью компьютерной программы AriaMx (Agilent Technologies, США).

2.9 Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных, полученных в экспериментах по оценке способности клеток к формированию колоний и частоты микроядер был проведен с помощью t-критерия Стьюдента в программном пакете Statistica 10 (Statsoft). Статистическая обработка результатов полнотранскриптомного экспрессионного анализа была проведена с помощью программной среды для статистического анализа R с использованием программы limma от Bioconductor на log2-трансформированных данных при условии фоновой коррекции необработанных данных чипов и межчиповой квантильной нормализации. Статистический анализ различий уровня экспрессии в каждой группе сравнения был проведен с помощью модифицированного t-критерия Стьюдента с оценкой значений доли ложноположительного предсказания (False Discovery Rate – FDR) и поправкой на множественность сравнения по методу Бенджамини-Хохберга. Были сформированы списки генов, экспрессия которых статистически значимо ($p < 0,05$) изменялась более чем в 2 раза по сравнению с исходной линией HeLa, и два списка, полученных после применения поправки на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга (FDR<0,4 и FDR<0,05). Кроме того, с помощью инструмента STRING (https://string-db.org/) для дифференциально экспрессирующихся генов были построены сети функциональных взаимодействий на уровне белков.

Помимо этого, обработка полученных в ходе исследования результатов была осуществлена с помощью инструмента DAVID, позволяющего производить анализ с обогащением уровня экспрессии дифференциально экспрессирующихся генов. При этом были использованы базы данных UCSC_TFBS, Gene Ontology и KEGG.

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

Разделы «Результаты и их обсуждение» и «Выводы» (стр. 55-65) содержат результаты интеллектуальной деятельности в научной сфере, изъяты из выпускной квалификационной работы в соответствии с пунктом 3.2 «Регламента размещения текста выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки НИ ТГУ» (Приказ №413/ОД от 24.05.2016).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василенко И.Я. Биологическое действие продуктов ядерного деления. М.: Бином, 2011. – 384 с.
2. Васильев С. А., Величевская А. И., Вишневская Т. В., Беленко А. А., Грибова О. В., Плаксин М. Б., Старцева Ж. А., Лебедев И. Н. Фоновое количество фокусов γH2AX в клетках человека как фактор индивидуальной радиочувствительности // Радиационная биология. Радиоэкология. 2015. – Т. 55. – № 4. – С. 402–410.
3. Горохов И. Е. Магнитоиндуцированное повышение резистентности животных при фракционированном рентгеновском облучении в малых дозах : автореф. дисс. на учен. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.01 “Радиобиология” / И.Е. Горохов. – Симферополь, 1994 – 236 с.
4. ГОСТ 8.638-2013 Государственная система обеспечения единства измерений. Метрологическое обеспечение радиационного контроля : дата введения 2-11-2016. – М. : Стандартинформ, 2016. – 70 с.
5. Григорьев Ю. Г. Физиологические механизмы реакции организма на облучение / Ю. Григорьев. – Ташкент: Фан, 1979. – 120-122 с.
6. Гусев Н. Г. Защита от ионизирующих излучений. – М.: Энергоатомиздат, 1989. – 341 с.
7. Гуськова А.К. Медицинские аспекты аварии на Чернобыльской атомной электростанции: материалы научной конференции / А. Гуськова. и др. – Киев: Здоровье, 1988. – С 143-153.
8. Деньгуб В. М., Смирнов В. Г. Единицы измерения. Словарь-справочник. – М.: Издательство стандартов. – 1990. – 189 с.
9. Зарицкая Л. П., Панов Б. В., Зарицкий Л. Н. Клинико-морфологические изменения органов и систем при радиационном поражении // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2007. – Т. 10. – № 4. – С. 75-80.
10. Ивановский Ю.А. Эффект радиационной стимуляции при действии больших и малых доз ионизирующего облучения на биологические объекты: дис. … док-ра биол. наук / Ивановский Ю.А. – ДГУ, 2006. – 232 с.
11. Котеров А. Н., Вайнсон А. А. Биологические и медицинские эффекты излучения с низкой ЛПЭ для различных диапозонов доз // Радиационная биология. Радиоэкология – 2015. – Т. 60. – № 3. – С. 5–31.
12. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) / под ред. В. К. Мкзурика, М. Ф. Ломанова. – ФИЗМАТЛИТ. – 2004. – 448 с.

13. Кузьменко Е. В. Современные подходы к определению групповой и индивидуальной радиочувствительности организма // Учёные записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского – 2011. – Т. 24. – № 63. – С. 109–122.

14. Курс лекций «ядерная медицина» [Электронный ресурс] – URL: http:// profbeckman. narod.ru/MED8.htm (дата обращения 14.05.2021)

15. Куценко С. А., Бутомко Н.В. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита. СПб: ООО «Издательство Фолиант». – 2004. – 528 с.

16. Радиация. Дозы, эффекты, риск. / пер. с англ. Банникова Ю. А. – М.: Мир, 1990. –79 с.

17. Тимофеев-Ресовский Н. В., Иванов В. И., Корогодин В. И. Применение принципа попадания в радиобиологии. – М.: Атомиздат. – 1968. – 228 с.

18. Снигирева Г.П. Возможности использования цитогенетических методов при обследовании населения, подвергшегося облучению в результате ядерных взрывов на Семипалатинском полигоне / Г. Снегирева, Н. Новицкая // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. – 2011 Т. 1, – № 11

19. Солдатов С. К., И. Б. Ушаков // Медицина труда и пром. экология. – 1995.— № 9.— С. 20-22.

20. Ярилин А. А. Радиация и иммунитет / А.А. Ярилин // Радиационная биология и радиоэкология. – 1997. – Т.37, вып. 4. – С. 597–603

21. Ярмоненко С. П. Радиобиология человека и животных. М.: Высшая школа, 2004. – 549 с.

22. Arjona A. The circadian gene mPer2 regulates the daily rhythm of IFN-gamma / A. Arjona, D.K. Sarkar // J. Interferon Cytokine Res. – 2006. – Vol.26 (9). – P. 645–649.

23. Borràs-Fresneda M. Differences in DNA Repair Capacity, Cell Death and Transcriptional Response after Irradiation between a Radiosensitive and a Radioresistant Cell Line // Sci. Rep. 2016. T. 6. № February. C. 1–11.

24. Bourd-Boittin K. Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor beta // Hepatology. 2011. T. 54. № 6. C. 2173–2184.

25. Campisi L., Cummings R. J., Magarian B. J. Death-Defining Immune Responses After Apoptosis // American Journal of Transplantation. - 2014. - Т. 14. - № 7. - P. 1488–1498

26. Cassarino D.S. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses and cell death in neurodegeneration / D.S. Cassarino, J.P. Bennett // Brain Res. Rev. – 1999. – Vol. 29. – P.1–25.

27. Chaplin D.D. Overview of the Immune Response // The Journal of Allergy and Clinical Immunology. - 2010. - T. 125. - № 2. - P. 3-23.

28. Davis A., Chen D. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining // Transl. Cancer Res. 2013. T. 2. № 3. C. 130–43.

29. Jasin M., Rothstein R. Repair of strand breaks by homologous recombination // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. T. 5. № 11. C. 1–18.

30. Kajanne R., Miettinen P., Tenhunen M., Leppa S. Transcription factor AP-1 promotes growth and radioresistance in prostate cancer cells // international Journal of oncology. - 2009. - T. 35. - № 6. - P. 1175–1182.

31. Li X., Heyer W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance // Cell Res. 2008. T. 18. № 1. C. 99–113.

32. Mahaney B. L., Meek K., Lees-miller S. P. Repair of ionizing radiation induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining // Biochemical Journal. - 2010. - T. 417. - № 3. - P. 639–650.

33. Frame M. C. Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behaviour // Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. 2002. T. 1602. № 2. C. 114–130.

34. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors This paper is dedicated to the memory of Prof. Donald F. Steiner (1930-2014) - Advisor, mentor, and discoverer of proinsulin. // Pharmacol. Res. 2015. T. 94. C. 9–25.

35. Nolan K. D., Kaur J., Isaacs J. S. Secreted heat shock protein 90 promotes prostate cancer stem cell heterogeneity // Oncotarget. 2016. T. 8. № 12. C. 19323–19341.

36. Christmann M., Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: Trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation // Nucleic Acids Res. 2013. T. 41. № 18. C. 8403–8420.

37. Ryseck R. P., Bravo R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. // Oncogene. 1991. T. 6. № 4. C. 533–42.

38. Criswell T. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation // Oncogene. 2003. T. 22. № 37 REV. ISS. 3. C. 5813–5827.

39. Oeckinghaus A., Ghosh S. The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2009. T. 1. № 4. C. a000034–a000034.

40. Kelwick R. и др. The *ADAMTS* (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family // Genome Biol. 2015. T. 16. № 1.

41. Hirohata S., Inagaki J., Ohtsuki T. Diverse Functions of a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif-1 // Yakugaku Zasshi. 2017. T. 137. № 7. C. 811–

814.

42. Freitas V. M. Decreased expression of *ADAMTS-1* in human breast tumors stimulates migration and invasion // Mol. Cancer. 2013. Т. 12. № 1. С. 1–15.

43. Martino-Echarri E. Contribution of ADAMTS1 as a tumor suppressor gene in human breast carcinoma. Linking its tumor inhibitory properties to its proteolytic activity on nidogen-1 and nidogen-2 // Int. J. Cancer. 2013. Т. 133. № 10. С. 2315–2324.

44. Birben E. Oxidative stress and antioxidant defense // World Allergy Organ. J. 2012. Т. 5. № 1. С. 9–19.

45. Borrego-Soto G., Ortiz-López R., Rojas-Martínez A. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer // Genet. Mol. Biol. 2015. Т. 38. № 4. С. 420–432.

46. Bouquet F. TGFβ1 inhibition increases the radiosensitivity of breast cancer cells in vitro and promotes tumor control by radiation in vivo // Clin. Cancer Res. 2011. Т. 17. № 21. С. 6754–6765.

47. Bublik D. R. Regulatory module involving FGF13, miR-504, and p53 regulates ribosomal biogenesis and supports cancer cell survival // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2017. Т. 114. № 4. С. E496–E505.

48. Chen R. E., Thorner J. Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Т. 1773. № 8. С. 1311–1340.

49. Cilensek Z. M. A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, interferon-γ, taxol and γ-irradiation // Cancer Biol. Ther. 2002. Т. 1. № 4. С. 380–387.

50. Concerns with low-level ionizing radiation / Jalow R.S. – Mayo. Clin. Proc, –1994. - P. 440.

51. Cosmic radiation at high altitudes and US cancer mortality / Mason T.J., Miller R.W. - Radiat. Res. –1974. - P. 306.

52. Dancea H. C., Shareef M. M., Ahmed M. M. Role of radiation-induced TGF-beta signaling in cancer therapy // Mol. Cell. Pharmacol. 2009. Т. 1. № 1. С. 44–56.

53. Dent P. MAPK pathways in radiation responses // Oncogene. 2003. Т. 22. № 37 REV. ISS. 3. С. 5885–5896.

54. Dertinger, H., Jung H. Molecular radiation biology. NY: Springer, 1970. 238 c.

55. Dittmann K. Radiation-induced lipid peroxidation activates src kinase and triggers nuclear EGFR transport // Radiother. Oncol. 2009. Т. 92. № 3. С. 379–382.

56. Eissa M. A. L. Promoter methylation of ADAMTS1 and BNC1 as potential biomarkers for early detection of pancreatic cancer in blood // Clin. Epigenetics. 2019. Т. 11. №

1. С. 1–10.

57. Eke I., Cordes N. Radiobiology goes 3D: How ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation // Radiother. Oncol. 2011. Т. 99. № 3. С. 271–278.

58. Eom K. Y. The effect of chemoradiotherapy with SRC tyrosine kinase inhibitor, PP2 and temozolomide on malignant glioma cells in vitro and in vivo // Cancer Res. Treat. 2016. Т. 48. № 2. С. 687–697.

59. Falck J., Coates J., Jackson S. P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage // Nature. 2005. Т. 434. № 7033. С. 605–611.

60. Fuks Z. Effects of extracellular matrix on the response of endothelial cells to radiation in vitro // Eur. J. Cancer. 1992. Т. 28. № 4–5. С. 725–731.

61. Goodhead D. T. Energy deposition stochastics and track structure: What about the target? // Radiat. Prot. Dosimetry. 2006. Т. 122. № 1–4. С. 3–15.

62. Gregory C. D., Devitt A. The macrophage and the apoptotic cell: An innate immune interaction viewed simplistically? // Immunology. 2004. Т. 113. № 1. С. 1–14.

63. Guttmann D. M., Koumenis C. The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer // Cancer Biol. Ther. 2011. Т. 12. № 12. С. 1023–1031.

64. Haase M. G. Down-regulation of Heat Shock Protein HSP90ab1 in Radiation-damaged Lung Cells other than Mast Cells // J. Histochem. Cytochem. 2014. Т. 62. № 5. С. 355–368.

65. He F., Jacobson A. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is only Part of the Story // Annu. Rev. Genet. 2015. Т. 49. № September. С. 339–366.

66. Hellweg C. E. Transcription factors in the cellular response to charged particle exposure // Front. Oncol. 2016. Т. 6. № MAR.

67. Herbert K. BRN2 suppresses apoptosis, reprograms DNA damage repair, and is associated with a high somatic mutation burden in melanoma // Genes Dev. 2019. Т. 33. № 5–6. С. 310–332.

68. Huertas P. DNA resection in eukaryotes: Deciding how to fix the break // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. Т. 17. № 1. С. 11–16.

69. Ilin A. A., Malygin A. A., Karpova G. G. Ribosomal protein S18e as a putative molecular staple for the 18S rRNA 3′-major domain core // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 2011. Т. 1814. № 4. С. 505–512.

70. Kim M. J. c-Src-p38 mitogen-activated protein kinase signaling is required for Akt activation in response to ionizing radiation // Mol. Cancer Res. 2008. Т. 6. № 12. С. 1872–1880.

71. Kirsch D. G. The future of radiobiology // J. Natl. Cancer Inst. 2018. Т. 110. № 4.

C. 329–340.

72. Koleck T. A. Polymorphisms in DNA repair and oxidative stress genes associated with pre-treatment cognitive function in breast cancer survivors: an exploratory study // Springerplus. 2016. T. 5. № 1.

73. Kovalev S.M. Estimation of radiation risk bosed in the concert of individual variability of radiosensitivity / S.M. Kovalev, L.E. Smirnova // AFRR1 Contact Report. – 1996. – № 96 – 1. – 202 p.

74. Krainova N. A. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. T. 49. № 9. C. 743–749.

75. Lieber M. R. The mechanism of DSB repair by the NHEJ // Annu. Rev. Biochem. 2011. T. 79. № 3. C. 181–211.

76. Maier P. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization // Int. J. Mol. Sci. 2016. T. 17. № 1.

77. Malewicz M., Perlmann T. Function of transcription factors at DNA lesions in DNA repair // Exp. Cell Res. 2014. T. 329. № 1. C. 94–100.

78. Mancuso M. The Radiation Bystander Effect and its Potential Implications for Human Health // Curr. Mol. Med. 2012. T. 12. № 5. C. 613–624.

79. Marková E. DNA repair foci and late apoptosis/necrosis in peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients undergoing radiotherapy // Int. J. Radiat. Biol. 2015. T. 91. № 12. C. 934–945.

80. Martin M. Coactivation of AP-1 activity and TGF-β1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation // Oncogene. 1997. T. 15. № 8. C. 981–989.

81. Matsuoka S. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage // Science (80-.). 2007. T. 316. № 5828. C. 1160–1166.

82. Mendoza M. C., Er E. E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation // Trends Biochem. Sci. 2011. T. 36. № 6. C. 320–328.

83. Mori R. Estimation of the radiation-induced DNA double-strand breaks number by considering cell cycle and absorbed dose per cell nucleus // J. Radiat. Res. 2018. T. 59. № 3. C. 253–260.

84. Moss R. W. Do antioxidants interfere with radiation therapy for cancer? // Integr. Cancer Ther. 2007. T. 6. № 3. C. 281–292.

85. Munshi A., Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response // Genes and Cancer. 2013. T. 4. № 9–10. C. 401–408.

86. 16. Thyroid diseases among atomic bomb survivors in Nagasaki / Nagataki S. – JAMA. –1994. - P. 370.

87. Nguyen K. V., Naviaux R. K., Nyhan W. L. Novel mutation in the human HPRT1 gene and the Lesch-Nyhan disease // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2017. Т. 36. № 11. С. 704–711.

88. Nickoloff J. A. Translational research in radiation-induced DNA damage signaling and repair // Transl. Cancer Res. 2017. Т. 6. № Suppl 5. С. S875–S891.

89. O'Driscoll M., Jeggo P. A. The role of double-strand break repair - Insights from human genetics // Nat. Rev. Genet. 2006. Т. 7. № 1. С. 45–54.

90. Peng Y. TUSC3 induces autophagy in human non-small cell lung cancer cells through Wnt/β-catenin signaling // Oncotarget. 2017. Т. 8. № 32. С. 52960–52974.

91. Robitzki A. Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reaggregates of the chick embryo // J. Neurochem. 1998. Т. 71. № 4. С. 1413–1420.

92. Soh U. J. Signal transduction by protease-activated receptors // Br. J. Pharmacol. 2010. Т. 160. № 2. С. 191–203.

93. Stankova K. HSP90 inhibitor geldanamycin as a radiation response modificator in human blood cells // Dose-Response. 2015. Т. 13. № 1. С. 1–11.

94. Stucki M., Jackson S. P. γH2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes // DNA Repair (Amst). 2006. Т. 5. № 5. С. 534–543.

95. Tanaka Y. Runx3 interacts with DNA repair protein Ku70 // Exp. Cell Res. 2007. Т. 313. № 15. С. 3251–3260.

96. Vanpouille-Box C. TGFβ is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity // Cancer Res. 2015. Т. 75. № 11. С. 2232–2242.

97. Vignard J., Mirey G., Salles B. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up // Radiother. Oncol. 2013. Т. 108. № 3. С. 362–369.

98. Wang B. Analyzing cell cycle checkpoints in response to ionizing radiation in mammalian cells // Methods Mol. Biol. 2014. Т. 1170. С. 313–320.

99. West S. C. Molecular views of recombination proteins and their control // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. Т. 4. № 6. С. 435–445.

100. Yang S. H., Sharrocks A. D., Whitmarsh A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation // Gene. 2013. Т. 513. № 1. С. 1–13.

101. Yoshida Y. ALPK2 is Crucial for luminal apoptosis and DNA repair-related gene expression in a three-dimensional colonic-crypt model // Anticancer Res. 2012. Т. 32. № 6. С. 2301–2308.

102. You Y. Latexin sensitizes leukemogenic cells to gammairradiation-induced cell-cycle arrest and cell death through Rps3 pathway // Cell Death Dis. 2014. Т. 5. № 10. С. 1–12.

103. Yu H. Typical cell signaling response to ionizing radiation: DNA damage and extranuclear damage // Chinese J. Cancer Res. 2012. Т. 24. № 2. С. 83–89.

Exactus Like (/index.php)

(/index.php/ru/) (/index.php/en/)

Поиск заимствований в научных текстах$^{\beta}$

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран... **Выбрать файл...**

Укажите год публикации: 2021

Выберите коллекции

- **Все**
- **Рефераты**
- **Авторефераты**
- **Иностранные конференции**
- **PubMed**
- **Википедия**
- **Российские конференции**
- **Иностранные журналы**
- **Российские журналы**
- **Энциклопедии**
- **Англоязычная википедия**

Анализировать

Проверить по расширенному списку коллекций системы Руконтекст (http://text.rucont.ru/like)

Год публикации: 2021.

Оценка оригинальности документа - 100.0%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 0.0%

100.00%

Просмотр заимствований в документе

Время выполнения: 16 с.

Заимствования отсутствуют

Дополнительно

Общеизвестные фрагменты

Значимые оригинальные фрагменты

Библиографические ссылки

Искать в Интернете

© 2015 2021 Институт системного анализа Российской академии наук (http://www.isa.ru/index.php?lang=ru)

Руководителю ООП «Генетика»
магистратуры по направлению
06.04.01 Биология ТГУ
доктору биол. наук, профессору В. Н. Стегнию
от магистранта 2 года обучения А. А. Мурашкиной

СЛУЖЕБНАЯ ЗАПИСКА

Прошу разрешить размещение текста магистерской диссертации «Роль металлопротеиназы межклеточного матрикса ADAMTS1 в формировании индивидуальной радиочувствительности», выполненной на базе Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Томский научно-исследовательский медицинский центр Российской академии наук» под руководством руководителя лаборатории цитогенетики, доктора биологических наук Васильева Станислава Анатольевича, в электронной библиотеке (репозитории) НИ ТГУ с изъятием следующих разделов, поскольку они содержат сведения, представляющие интеллектуальную собственность НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ: «РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ», «ВЫВОДЫ».

Дата: 11.06.2021 _____ / А.А. Мурашкина
подпись

Дата: 11.06.2021 _____ / В.Н. Стегний
подпись