

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В НОРМАЛЬНЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. В. Ф. Михайлов¹, *, Л. В. Шуленина¹, Н. Ф. Раева¹, И. М. Васильева², Д. В. Салеева¹,
М. В. Незнанова¹, Г. Д. Засухина², **

¹ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 123098 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва, 119991 Россия

*E-mail: vfm@mail.ru

**E-mail: Zasukhina@vigg.ru

Поступила в редакцию 15.01.2019 г.

После доработки 07.03.2019 г.

Принята к публикации 12.03.2019 г.

Изучено влияние рентгеновского излучения (0.1 Гр) на экспрессию ряда генов и регуляторных РНК (микроРНК и длинные некодирующие РНК) в нормальных лимфоцитах человека и Т-лимфобластных клетках человека (линия Jurkat). Через 1 ч после действия радиации в малой дозе в лимфоцитах обнаружена активация экспрессии *P53* и снижение уровня зрелых *miR-27a* и *miR-181a*, имеющих в качестве мишени мРНК гена *P53*, а также ингибирование активности фактора *NFκB*, тестируемое по снижению содержания мРНК генов *RHOA*, *cdc42* и *IL6*. Через 4 ч наблюдали нормализацию показателей. В клетках линии Jurkat в этот период, наоборот, отмечали увеличение содержания мРНК гена *NFκB(p65)* и мРНК его мишени – гена *IL6*. Проведенное через 4 ч повторное облучение клеток в дозе 5 Гр показало наличие радиационного адаптивного ответа (АО) по критерию выживаемости в лимфоцитах и его отсутствие в клетках Jurkat. У выживших через 20 ч лимфоцитов по различиям между группами 5 Гр и (0.1 Гр + 5 Гр) выявлены показатели, характерные для АО (мРНК гена *P53*, *NEAT1*, *miR-181a*, *miR-107*). Полученные результаты свидетельствуют об активации разных внутриклеточных систем после стрессового воздействия радиации в малой дозе на лимфоциты и клетки Jurkat. Этот подход может быть использован для оптимизации эффективности лучевой терапии, когда применяется предварительное облучение в малой дозе, которая увеличивает радиорезистентность окружающих опухоль нормальных тканей.

Ключевые слова: адаптивный ответ, длинные некодирующие РНК, ионизирующая радиация, малые дозы, микроРНК, *NFκB*, *P53*

DOI: 10.1134/S0041377119060051

Изучение действия радиации в малых дозах, с которыми человек и все живые организмы сталкиваются в силу природных или технологических обстоятельств, приобретает повышенный интерес и требует глубокой научной оценки последствий этих событий. Кроме того, изучение воздействия малых доз радиации на человека, безусловно, должно интенсифицироваться в связи с возрастанием числа длительных космических полетов, а также применения различных медицинских диагностических процедур. Однако последствия радиоответа при малых дозах радиации обусловлены огромными индивидуальными различиями людей по чувствительности к этому виду стрессового воздействия (Komova et al., 2018).

Многочисленные экспериментальные работы показали, что биологический эффект малых доз зависит от типа клеток, тканей и вида животных, типа излучений и экспериментальных условий. Установлено, что малые дозы радиации могут приводить к развитию таких эффектов как гормезис, адаптивный ответ (АО), изменять радиорезистентность, влиять на различные системы жизнедеятельности, в том числе на развитие онкозаболеваний (Yang et al., 2016a; Засухина и др. 2017). Малые дозы радиации вызывают глобальные изменения экспрессии генов в клетках (Fachin et al., 2007; Gruel et al., 2008). Изучение АО показало, что при предварительном облучении малыми дозами (до 0.1–0.2 Гр) в нормальных клетках человека через несколько часов может повышаться резистентность клеток на 30–60% (по показателям выживаемости и мутагенеза) к последующему облучению высокими дозами, тогда как в та-

Принятые сокращения: АО – адаптивный ответ, днРНК – длинные некодирующие РНК; ЛТ – лучевая терапия; *miR* – микроРНК.

ких же условиях во многих злокачественных клетках индуцированная резистентность не возникает (Jiang et al., 2008; Yang et al., 2016a). Исследования, проведенные различными авторами, показали, что при АО после действия малых доз радиации изменяется экспрессия генов, участвующих в инактивации активных форм кислорода, репарации повреждений ДНК и пролиферативных процессах (Shelke, Das, 2015; Gandhi, 2018; Kawamura et al., 2018; Pajic et al., 2018). Вызванные действием радиации в малых дозах ответы нормальных клеток отсутствуют во многих раковых клетках, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* (Jiang et al., 2008; Yang et al., 2016b), что может быть использовано для защиты нормальных клеток при лучевой терапии (ЛТ).

До сих пор выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе радиационного АО, далеко от завершения (Серебряный, 2015). Существуют значительные индивидуальные различия в проявлении АО, определяемого в лимфоцитах крови по хромосомным аберрациям (Tarió, Jacob, 2007). Предполагается, что эти различия обусловлены особенностями функционирования генома. Регуляция экспрессии генов осуществляется не только на геномном, но и на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях с участием регуляторных РНК (miR, днРНК и др.), имеющих многочисленные потенциальные мРНК-мишени. Установлены сложные изменения функционирования регуляторных РНК после воздействия малых доз радиации. Эти РНК могут влиять на индивидуальный биологический ответ клетки после воздействия ионизирующей радиации в малых дозах, модифицируя их радиорезистентность.

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что внутриклеточные системы, контролируемые транскрипционными факторами P53 и NFκB принимают участие в формировании АО (Ahmed et al., 2009; Yuan et al., 2010). Показано, что функционирование регуляторных РНК, участвующих в работе этих систем, изменяется после действия ионизирующей радиации и при онкогенезе (Михайлов и др., 2018; Vae et al., 2015; O'Leary et al., 2015). Важность исследования участия регуляторных РНК при АО подтверждается данными о том, что изменение профиля экспрессии miR и днРНК после радиационного воздействия зависит от того, являются клетки P53-позитивными или P53-мутантными, что часто наблюдается в онкотрансформированных клетках (Засухина и др., 2017).

Для индивидуальной оценки эффективности малых доз радиации для защиты нормальных клеток при ЛТ необходимы дальнейшие исследования молекулярных механизмов АО и на их основе выявление показателей характеризующих межиндивидуальные различия АО.

Цель настоящего исследования — сравнить влияние малых доз ионизирующей радиации на функциональную активность генов P53, NFκB и ряда других

генов, содержание miR и днРНК в нормальных лимфоцитах и клетках Т-лимфобластного лейкоза человека (линия Jurkat) при развитии АО.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и условия культивирования лимфоцитов крови человека. Лимфоциты выделяли из цельной крови здоровых доноров обоего пола не позднее чем через 24 ч от момента взятия крови в вакутейнере с ЭДТА при помощи стандартной процедуры разделения на Ficoll-Paque с плотностью 1.077 г/мл (Pharmacia, Швеция). Лимфоциты переносили в отдельные пробирки, однократно отмывали и ресуспензировали в полной культуральной среде RPMI-1640, рН 7.35 (Панэко, Россия), содержащей глутамин (0.58 мг/мл), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл), 10% телячьей эмбриональной сыворотки и фитогемагглютинин (ФГА) (3.6 мкг/мл). Конечная концентрация клеток составляла около 1 млн кл./мл. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ (инкубатор Sanyo MSO-5AC, Япония). Дальнейшее культивирование стимулированных к пролиферации лимфоцитов проводили в той же среде RPMI-1640 при 37°C в течение 43 ч, однократно пересаживая клетки через 1 сут после выделения.

Исследования были выполнены в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice).

Культивирование клеток Т-лимфобластного лейкоза линии Jurkat осуществляли в той же культуральной среде RPMI-1640 рН 7.35, что и лимфоциты при 37°C и 5% CO₂ с теми же добавками, исключая ФГА. Смену среды проводили 1 раз в 2 сут.

Облучение нормальных лимфоцитов и клеток Jurkat. После инкубационного периода в 36 ч клеточные культуры в закрытых чашках Петри облучали в рентгеновской установке РУБ РУСТ-М1 (ООО Диагностика М, Россия) в дозе 0.1 или 5 Гр при мощности дозы 0.2 Гр/мин (200 кВ, 1.2 мА, 1.5 мм Al). Через 4 ч после облучения в дозе 0.1 Гр часть клеток повторно облучали в дозе 5 Гр. Были изучены различные по дозе облучения экспериментальные группы клеток (нормальные лимфоциты и лимфобластные клетки линии Jurkat): 0 Гр (контроль), 0.1 и 5 Гр, а также последовательно (0.1 Гр + 5.0 Гр). Дозы облучения 0.1 и 5 Гр были выбраны как наиболее эффективные для формирования АО. Через 20 ч после облучения в дозе 5 Гр определяли жизнеспособность клеток и профили экспрессии генов и некодирующих РНК.

Определение жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток в экспериментальных группах оценивали с помощью набора Cell Counting Kit-8 (ССК-8) (Dojindo Molecular Technologies, Inc., США). Для этого, не меняя среду, в ячейки планшета к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 10 мкл раствора ССК-8, содержащего водорастворимую

тетразолиевую соль WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disul-fophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] и электронный медиатор. Число живых клеток оценивали спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера Bio Rad Elisa Reader (США) при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 690 нм).

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени. Общую РНК выделяли тризольным методом с использованием набора реактивов Trizol RNA Prep 100 (ООО Лаборатория Изоген, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Конверсию РНК в кДНК проводили с помощью набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции GenePak RT Core (ООО Лаборатория Изоген, Россия) с использованием рандомизированных праймеров (N_6 -, N_9 -). Реакцию обратной транскрипции для miR осуществляли по технологии “stem loop”. Использовали следующие stem-loop-праймеры: 5'-GTCTG-TATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTG-GATACGACACTCAC C-3' для miR181-a, 5'-CTCAACTGGTGTCTGTCGTCGGAGTCGGCAATTCAGTTG-AGTG ATAGCC-3' для miR-107, 5'-CTCAACTGGT-GTCGTGGAGTTCGGCAATTCAGTTGAGCTCGGA-ACT-3' для miR-27a (50 нМ). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе “DTprime 5M3” (НПО ДНК-Технология, Россия) с использованием красителя SYBR Green I (Thermo Scientific, США) или TaqMan-зонда. Условия ПЦР для генов и miR были подобраны эмпирическим путем с помощью температурного градиента по матрице. Каждую ПЦР проводили не менее двух раз. Результаты, полученные с помощью ПЦР, анализировали методом $\Delta\Delta C_t$. В качестве эндогенного контроля экспрессии генов и miR был выбран ген β -актина. Нуклеотидная последовательность праймеров и зондов для исследуемых генов, а также условия для ПЦР в реальном времени представлены в табл. 1.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета статистических программ STATISTICA 7.0. В экспериментах по выживаемости определяли среднюю арифметическую величину и стандартное отклонение, а при оценке экспрессии генов — медиану и квартили. Значения медианы в контрольной группе были приняты за 1, а значения медианы в экспериментальных группах показывали во сколько раз уровень экспрессии гена выше или ниже относительно контрольной группы. Для оценки достоверности различий применяли критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна–Уитни (при уровне значимости $P \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выживаемость клеток. Результаты оценки выживаемости лимфоцитов и клеток линии Jurkat представлены на рис. 1. На рисунке видно, что через 20 ч после облучения клеток Jurkat в дозе 5 Гр наблюдается статистически значимое снижение их выживаемости.

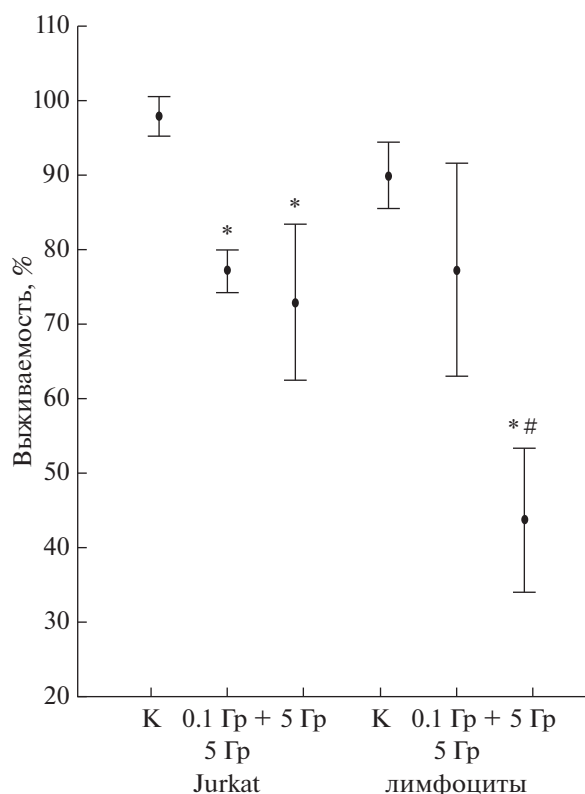


Рис. 1. Выживаемость лимфоцитов и клеток линии Jurkat в контроле (К), через 20 ч после однократного воздействия радиации в дозе 5 Гр (5 Гр), а также комбинированного облучения в дозах 0.1 Гр и через 4 ч 5 Гр (0.1 Гр + 5 Гр). Даны средние значения и их стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Различия статистически значимы: * между интактными (К) и облученными клетками ($P < 0.05$); # между группами (0.1 Гр + 5 Гр) и 5 Гр ($P < 0.05$).

мости. Предварительное воздействие радиации в малой дозе не приводило к увеличению радиорезистентности этих лимфобластных клеток, что выявлялось по отсутствию различий в выживаемости клеток между группой с комбинированным облучением в дозах 0.1 Гр и через 4 ч воздействием на них 5 Гр и группой, получившей однократное действие радиации 5 Гр (рис. 1). Иная картина наблюдалась для лимфоцитов, выделенных из периферической крови здоровых доноров. Наблюдали значимые различия выживаемости лимфоцитов через 20 ч после облучения в дозе 5 Гр по сравнению с группой, которая включала предварительное облучение в малой дозе 0.1 Гр и последующее воздействие в дозе 5 Гр. Таким образом, в проведенном эксперименте наблюдали формирование АО в лимфоцитах здоровых доноров, а в клетках линии Jurkat с мутантным геном *P53* — нет.

Клетки линии Jurkat имеют значительные структурные нарушения генома. В частности, в этих клетках обнаружено наличие стоп-кодонов в генах онкопрессорах *P53* и *MSH2*, обнаружено большое число му-

Таблица 1. Последовательность праймеров для ПЦР в реальном времени, а также условия ПЦР для генов, днРНК и miR

Ген	Праймеры: прямой (F) и обратный (R); зонды для ПЦР (их конечная концентрация, нМ)	Условия ПЦР в реальном времени
<i>β-актин (ACTB)</i>	F: 5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3' (200) R: 5'-TGGAAGGTGGACAGCGAGG-3' (200)	Предварительная денатурация (ПД): 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/35 с и 72°C/40 с
<i>P53</i>	F: 5'-GCCCCAGGGAGCACTA-3' (200) R: 5'-GGGAGAGGAGCTGGTGTG-3' (200)	ПД: 95°C/10 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/45 с и 72°C/60 с
<i>PTEN</i>	F: 5'-CAAGATGATGTTTGAACATTC CAATG-3' (300) R: 5'-CCTTTAGCTGGCAGACCACAA-3' (300)	ПД: 95°C/10 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/20 с и 72°C/40 с
<i>Sp1</i>	F: 5'-CCACCATGAGCGACCAAGAT-3' (100) R: 5'-TGAAAAGGCACCACCACCAT-3' (100)	ПД: 94°C/10 мин, далее 40 циклов: 94°C/30 с, 52°C/15 с
<i>RhoA</i>	F: 5'-CGCTTTTGGGTACATGGAGT-3' (200) R: 5'-CAAGACAAGGCACCCAGATT-3' (200)	ПД: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/60 с
<i>Cdc42</i>	F: 5'-GCCCCGTGACCTGAAGGCTGTCA-3' (300) R: 5'-TGCTTTTAGTATGATGCCGACA CCA-3' (300)	ПД: 95°C/5 мин, далее 40 циклов: 94°C/15 с, 66°C/40 с и 72°C/30 с
<i>NFκB (p65)</i>	F: 5'-GTTACACAGACCTGGCATCC-3' (300) R: 5'-TGTCAGTAGGCGAGTTATAGC-3' (300)	ПД: 94°C/2 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/30 с и 70°C/30 с
<i>IAP1</i>	F: 5'-CTACAATGGAGTGCTCATCTG-3' (300) R: 5'-CAGCCAGAGGCGATATTCATC-3' (300)	ПД: 94°C/2 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 60°C/30 с и 70°C/30 с
<i>IL6</i>	F: 5'-GCCTTCGGTCCAGTTGCCTT-3' (300) R: 5'-AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC-3' (300)	ПД: 94°C/2 мин, далее 45 циклов: 94°C/15 с, 51°C/30 с и 70°C/30 с
<i>IRAK1</i>	F: 5'-ACTGGCCCTTGGCAGCTC-3' (300) R: 5'-GGCCAGCTTCTGGACCATC-3' (300) TaqMan Probe: 5'-6FAM-ATCATCGTCG TCAGAGCCACCGC-BHQ1-3' (200)	ПД: 95°C/10 мин, далее 45 циклов: 95°C/15 с, 60°C/1мин
NEAT1	F: 5'-CTTCTCCCTTTAACTTATCCAT TCAC-3' (100) R: 5'-CTTCTCCACCATTACCAAC AATAC-3' (100)	ПД с активацией UDG-гликозилазы (0.05 ед/мкл): 50°C/2 мин, 95°C/10 мин, далее 45 циклов: 95°C/15 с, 60°C/20 с
MALAT1	F: 5'-GCAGTATTGCATGTTAGG-3' (500) R: 5'-CCTCTGAGTGAAGTGTACTAT C-3' (500)	ПД: 95°C/10 мин, далее 45 циклов: 94°C/10 с, 65°C/20 с (с температурным инкрементом до 55°C) и 72°C/30 с
RoR	F: 5'-CTCAGTGGGGAAGACTCCAG-3' (200) R: 5'-AGGAAGCCTGAGAGTTGGC-3' (200)	ПД: 94°C/10 мин, далее 45 циклов: 95°C/15 с, 60°C/15 с
Gas5	F: 5'-TGAAGTCCTAAAGAGCAAGCC-3' (200) R: 5'-ACCAGGAGCAGAACCATTAAAG-3' (200)	ПД: 94°C/10 мин, далее 45 циклов: 95°C/15 с, 60°C/15 с
HOTAIR	F: 5'-GGCGGATGCAAGTTAATAAAAC-3' (500) R: 5'-TACGCCTGAGTGTTCACGGAG-3' (500)	ПД: 95°C/10 мин, далее 45 циклов: 94°C/10 с, 65°C/20 с (с температурным инкрементом до 55°C) и 72°C/30 с
miR181-a	F: 5'-GCGGCAACATTCAACGCTGTC-3' (300) R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' (300)	ПД с активацией UDG-гликозилазы (0.05 ед/мкл): 50°C/2 мин, 95°C/10 мин, далее 45 циклов: 95°C/20 с, 63°C/35 с
miR-107	F: 5'-ACACTCCAGCTGGGAGCAGCAT TGACAGGG-3' (250) R: 5'-TGGTGTCTGAGGATCGGCAATT CAGTTG-3' (250)	ПД: 95°C/10 мин, далее 45 циклов: 94°C/15 с, 64°C/40 с и 72°C/20 с
miR-27a	F: 5'-ACACTCCAGCTGGGTTACAGTG GCTAAG-3' (400) R: 5'-TGGTGTCTGAGGATCGGCAATT CAGTTG-3' (400)	ПД: 95°C/10 мин, далее 40 циклов: 95°C/15 с, 54°C/45 с и 72°C/35 с

таций в гене *BAX* (Gioia et al., 2018). Предполагается, что синтез усеченной формы транскрипционного фактора P53 из-за присутствия стоп-кодона в экзоне 6 в этих клетках может приводить к появлению онкогенной формы белка P53, препятствующей реализации адаптивной программы и изменяющей экспрессию генов, формирующих ответ на стресс воздействия.

Влияние малых доз ионизирующей радиации на активность транскрипционных факторов P53 и NFκB в лимфоцитах и клетках линии Jurkat. Оба фактора являются важными звеньями в формировании АО. Использование их ингибиторов (пифитрина-α, ВАУ11-7082) показало, что эти соединения способны предотвращать развитие АО, либо ослаблять его (Yuan et al., 2010). Транскрипционные факторы P53 и NFκB имеют свои гены-мишени, воздействие на промоторную часть которых приводит к активации экспрессии генов, необходимых для реализации P53- и NFκB-зависимых внутриклеточных программ. При этом регуляторные РНК способны модифицировать экспрессию белков P53- и NFκB-систем. Установлено около 30 генов miR, являющихся мишенью для транскрипционного фактора P53. В результате действия P53 на промоторы этих генов наблюдается усиление их транскрипции. Ингибирование экспрессии после воздействия P53 установлено для 5 генов miR. В свою очередь выявлено более 70 miR, мишенями которых являются мРНК гена P53, либо его ингибиторов – MDM2 и MDM4. Эти miR регулируют уровень P53 в клетках (Luo et al., 2018). Не менее впечатляющая картина обнаруживается и во взаимодействии днРНК с P53 (Zhang et al., 2014). Сложные регуляторные взаимодействия наблюдаются между P53 и NFκB, между NFκB и регуляторными РНК.

Из перечисленных соединений, взаимодействующих с транскрипционными факторами, нами были выбраны показатели, позволяющие оценить изменения функционирования P53- и NFκB-систем в клетках, включающие мРНК белок-синтезирующих генов, miR и днРНК, взаимодействующие с P53 и NFκB.

В табл. 2 представлены сведения о содержании мРНК белок-кодирующих генов через 1 и 4 ч после воздействия 0.1 Гр рентгеновского излучения на нормальные лимфоциты и клетки Jurkat. Из генов, представленных в табл. 2, *P TEN* является мишенью транскрипционного фактора P53. Sp1 связан с P53, поскольку и Sp1-истощение, и эктопическая экспрессия Sp1 оказывали выраженное влияние на примерно половину P53-регулируемых генов (Oppenheim, Lahav, 2017). *Rho*, *cdc42*, *IRAK1*, *IAP1* и *IL6* являются мишенями ядерного фактора NFκB.

Через 1 ч после воздействия радиации (0.1 Гр) на лимфоциты в клетках наблюдали статистически значимое увеличение содержания мРНК гена *P53*, и снижение содержания мРНК генов *RHO-A*, *cdc42* и *IL6* (табл. 2). Таким образом, в этот период времени наблюдали увеличение транскрипции *P53* и сниже-

ние функциональной активности транскрипционного фактора NFκB в лимфоцитах. Через 4 ч, в то время когда проводили повторное облучение клеток в дозе 5 Гр, все мРНК белоксинтезирующих генов возвращались к уровню интактного контроля. В клетках линии Jurkat наблюдали иную картину. Через 1 ч после действия малой дозы радиации (0.1 Гр) увеличивалось содержание мРНК гена *NFκB(p65)*, являющегося субъединицей комплекса NFκB, и уровня мРНК его гена-мишени *IL6*. Через 4 ч выявлено снижение мРНК генов *P53*, *NFκB(p65)* и *IAP1*.

Содержание зрелых miR и днРНК через 1 и 4 ч после воздействия 0.1 Гр рентгеновского излучения на лимфоциты и клетки линии Jurkat представлено в табл. 3.

Промотор гена miR-107 является мишенью транскрипционного фактора P53 (Boominathan, 2010). С другой стороны, толл-подобный рецептор 4 (TLR4) может подавлять экспрессию miR-107 через путь NFκB (Hennessy et al., 2011). Наоборот, мРНК гена *P53* является потенциальной мишенью miR-181a (Raut et al., 2016) и miR-27a (Maqbool et al., 2016). ДнРНК NEAT1 ингибирует P53, но P53 активирует синтез NEAT1 (Adriaens et al., 2016). Выявлены антагонистические отношения между P53 и днРНК MALAT1 (Grossi et al., 2016). ДнРНК GAS5 имеет отрицательную обратную регуляторную петлю с miR-21, следовательно, и с транскрипционным фактором этой miR – NFκB.

Как видно из табл. 3 в лимфоцитах через 1 ч после облучения в дозе 0.1 Гр наблюдается увеличение содержания днРНК MALAT1 и GAS5, а также снижение экспрессии miR-27a и miR-181a, а через 4 ч – нормализация этих показателей. В клетках Jurkat через 1 ч увеличивается днРНК NEAT1 и снижается экспрессия miR-181a и miR-107. Через 4 ч после применения дозы 0.1 Гр, в период воздействия на клетки 5 Гр сохранялось снижение экспрессии miR-107.

Анализ представленных в табл. 2 и 3 результатов приводит к выводу о том, что реакция лимфоцитов и клеток Jurkat на облучение в малой дозе различна. В первый час после облучения в лимфоцитах активируется P53-система и снижается активность NFκB-ответа. Через 4 ч показатели восстанавливаются. В клетках Jurkat наблюдаются противоположные изменения: через 1 ч активируется система NFκB.

Влияние адаптирующей дозы облучения 0.1 Гр на изменения активности систем P53 и NFκB в лимфоцитах и клетках Jurkat, возникающие через 20 ч после облучения в повреждающей дозе 5 Гр. Результаты определения содержания мРНК белок-кодирующих генов в лимфоцитах и клетках Jurkat в группах 5 Гр и (0.1 Гр + 5 Гр) через 20 ч после облучения представлены на рис. 2. В лимфоцитах группы 5 Гр наблюдается увеличение содержания мРНК гена *P53* и снижение экспрессии *NFκB*, *IAP1* и *IL6*. В лимфоцитах группы (0.1 Гр + 5 Гр) экспрессия генов, за исключением *IAP1*, не отличается от уровня контрольных

Таблица 2. Содержание мРНК белок-кодирующих генов в контроле (К) и через 1 и 4 ч после воздействия 0.1 Гр рентгеновского излучения на лимфоциты и клетки линии Jurkat

мРНК гена	Содержание мРНК							
	Лимфоциты				Jurkat			
	через 1 ч		через 4 ч		через 1 ч		через 4 ч	
	К	0.1 Гр	К	0.1 Гр	К	0.1 Гр	К	0.1 Гр
<i>RhoA</i>	1.00 (0.93–1.14)	0.57 ^a (0.46–0.61)	1.02 (0.54–1.37)	1.07 (0.81–1.86)	1.01 (0.37–1.68)	0.68 (0.13–0.78)	1.01 (0.37–1.68)	1.08 (0.79–1.37)
<i>cdc42</i>	1.00 (0.81–1.23)	0.57 ^a (0.46–0.66)	1.00 (0.59–1.39)	1.1 (0.78–2.37)	1.00 (0.57–2.46)	0.76 (0.16–1.00)	1.00 (0.57–2.46)	1.19 (0.81–1.52)
<i>Sp1</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	1.00 (0.87–1.00)	1.21 (0.76–1.41)	1.00 (0.87–1.00)	1.00 (1.00–1.41)
<i>PTEN</i>	1.00 (0.93–1.07)	1.07 (1.00–1.51)	1.05 (0.68–1.79)	0.9 (0.9–0.97)	1.00 (0.93–1.41)	1.19 (0.87–1.23)	1.00 (0.93–1.41)	1.15 (1.07–1.41)
<i>P53</i>	1.00 (0.95–1.04)	1.62 ^a (1.14–1.74)	1.01 (0.90–1.15)	1.04 (0.97–1.19)	1.0 (0.87–1.07)	0.77 (0.71–0.81)	1.00 (0.87–1.07)	0.65 ^a (0.62–0.75)
<i>NFκB(p65)</i>	1.0 (0.89–1.07)	1.07 (1.00–1.15)	1.00 (0.87–2.28)	1.07 (1.07–1.74)	1.00 (0.76–1.15)	1.68 ^a (1.32–2.14)	1.00 (0.76–1.15)	0.73 (0.57–0.87)
<i>IAP1</i>	1.0 (0.84–1.15)	0.97 (0.90–1.37)	1.0 (0.93–1.20)	1.07 (1.0–1.15)	1.00 (0.90–1.11)	1.04 (0.84–1.48)	1.0 (0.9–1.11)	0.48 ^a (0.37–0.64)
<i>IL6</i>	1.0 (1.00–1.00)	0.71 ^a (0.44–0.87)	1.0 (0.52–2.09)	0.87 (0.25–1.15)	1.00 (0.87–1.00)	3.25 ^a (2.94–4.87)	1.00 (0.90–1.07)	1.13 (0.93–1.41)
<i>IRAK1</i>	1.0 (0.93–1.15)	1.0 (0.81–1.74)	1.01 (0.74–1.19)	0.76 (0.66–0.87)	1.01 (0.84–1.11)	0.90 (0.78–1.04)	1.01 (0.84–1.11)	0.93 (0.84–1.46)

Примечание к табл. 2 и 3. Данные представлены в виде медиан и квартилей. Значения медианы в контрольной группе приняты за 1, а значения медианы в экспериментальных группах показывают во сколько раз уровень экспрессии гена выше или ниже относительно контрольной группы. ^aРазличия между интактным контролем и облученными клетками статистически значимы ($P < 0.05$).

значений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в лимфоцитах после радиационного воздействия в повреждающей дозе снижается активность NFκB-ответа. Статистически значимые различия содержания мРНК гена *P53* в группах 5 Гр и (0.1 Гр + 5 Гр) подтверждают участие *P53* зависимой системы сохранения генома в формировании АО (рис. 2б). Аналогичный эксперимент на клетках линии Jurkat показал снижение уровня мРНК *P53* и увеличение мРНК гена *Sp1* в группе (0.1 Гр + 5 Гр), а также выявил статистически значимые различия между группами 5 Гр и (0.1 Гр + 5 Гр) по показателю мРНК гена *IRAK1* (рис. 2а).

На рис. 3 представлены результаты исследований экспрессии днРНК в клетках линии Jurkat (рис. 3а) и нормальных лимфоцитах (рис. 3б) через 20 ч после дей-

ствия радиации. В это время в лимфоцитах группы 5 Гр отмечено увеличение содержания днРНК RoR, MALAT1 и NEAT1, а в группе (0.1 Гр + 5 Гр), в которой наблюдался АО, зафиксировано увеличение экспрессии лишь днРНК RoR (рис. 3б). В клетках линии Jurkat обнаружено увеличение содержания лишь одной днРНК RoR (рис. 3а).

На рис. 4 представлены результаты изучения экспрессии miR в клетках линии Jurkat (рис. 4а) и нормальных лимфоцитах (рис. 4б) через 20 ч после действия радиации. Различия между группами 5 Гр и (0.1 Гр + 5 Гр) по изученным показателям проявляются только в лимфоцитах: содержание зрелой miR-181a в группе (0.1 Гр + 5 Гр) было выше, чем в группе 5 Гр, а miR-107 – ниже (рис. 4б).

Таблица 3. Содержание зрелых микроРНК и длинных некодирующих РНК (днРНК) в контроле (К) и через 1 и 4 ч после воздействия рентгеновского излучения (0.1 Гр) на лимфоциты и клетки Jurkat

РНК	Содержание микроРНК и днРНК							
	Лимфоциты				Jurkat			
	через 1 ч		через 4 ч		через 1 ч		через 4 ч	
	К	0.1 Гр	К	0.1 Гр	К	0.1 Гр	К	0.1 Гр
днРНК RoR	1.00 (0.95–1.31)	1.52 (1.23–1.62)	1.02 (0.69–1.42)	0.81 (0.75–1.00)	1.02 (0.78–1.36)	1.34 (1.03–1.68)	1.00 (0.78–1.36)	1.11 (0.73–1.19)
днРНК MALAT1	1.00 (0.53–1.04)	1.41 ^a (1.12–1.23)	1.00 (0.82–1.11)	0.84 (0.64–0.97)	1.00 (0.81–1.74)	1.81 (1.23–2.30)	1.00 (0.81–1.74)	1.57 (1.41–2.0)
днРНК GAS5	1.00 (0.71–1.07)	1.41 ^a (1.23–1.62)	1.00 (0.52–1.37)	0.66 (0.47–0.81)	1.02 (0.66–1.51)	1.03 (1.00–1.15)	1.02 (0.66–1.52)	0.90 (0.87–1.15)
днРНК HOTAIR	1.00 (0.38–1.23)	2.29 (0.66–4.00)	1.1 (0.44–3.84)	1.0 (0.35–4.81)	1.02 (0.66–1.51)	0.93 (0.57–1.23)	1.02 (0.65–1.52)	1.15 (0.93–1.23)
днРНК NEAT1	1.00 (0.57–1.07)	0.81 (0.67–1.33)	1.06 (0.68–2.02)	1.7 (0.75–2.14)	1.00 (0.73–1.37)	1.94 ^a (1.68–2.38)	1.00 (0.73–1.36)	1.46 (1.36–1.80)
miR-107	1.00 (0.95–1.04)	1.15 (0.76–1.32)	1.00 (0.3–2.64)	1.14 (0.25–8.57)	1.01 (0.30–1.57)	0.02 ^a (0.02–0.02)	1.00 (0.29–1.56)	0.12 ^a (0.12–0.14)
miR-181a	1.01 (0.71–1.33)	0.37 ^a (0.35–0.57)	1.00 (0.56–1.95)	1.00 (0.81–1.23)	1.00 (0.61–1.07)	0.11 ^a (0.04–0.31)	1.01 (0.61–1.07)	0.78 (0.13–0.93)
miR-27a	1.00 (0.71–1.07)	0.41 (0.27–1.04)	1.07 (0.68–1.46)	1.02 (0.56–1.43)	1.00 (0.76–1.51)	1.23 (1.00–1.41)	1.00 (0.75–1.52)	1.37 (0.87–2.00)

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что в лимфоцитах наличие АО сопровождалось следующими событиями.

1) Активацией экспрессии P53 через 1 ч после действия малой дозы радиации, которая проявляется в увеличении мРНК гена P53 (на транскрипционном уровне) и снижением содержания зрелых miR-27a и miR-181a, имеющих в качестве мишени мРНК гена P53 (на посттранскрипционном уровне), а также увеличением содержания днРНК Gas5, выполняющей функцию поддержания активности P53.

2) Снижением активности системы NFκB через 1 ч после действия малой дозы радиации, которая проявляется снижением мРНК генов мишеней транскрипционного фактора NFκB, а именно мРНК генов *RHO-A*, *cdc42* и *IL6* и увеличением содержания днРНК Gas5. Снижение содержания мРНК гена *NFκB(p65)* сохраняется и через 20 ч после облучения в дозе 5 Гр.

В клетках линии Jurkat, не проявляющих АО после воздействия малой дозы 0.1 Гр, на иницирующей стадии АО не возникало активации системы

P53. Наоборот, наблюдалось увеличение содержания мРНК гена *NFκB(p65)* и мРНК его мишени гена *IL6*. Различий исследуемых показателей между группами 5 Гр и (0.1 Гр + 5 Гр) через 20 ч после облучения в дозе 5 Гр, за исключением днРНК NEAT1, также не обнаруживалось.

Воздействие малых доз радиации в последнее время приобретает особое значение, принимая во внимание распространение медицинских процедур, в том числе компьютерной томографии (КТ). Однако часто пациент подвергается этому обследованию 2–3 раза в мес., что, естественно, может быть небезопасным для людей, у которых может быть повышена чувствительность к радиации, обусловленная, например, особенностями генетического полиморфизма и другими факторами. Малые дозы радиации в отдаленные сроки могут способствовать развитию ряда заболеваний человека. Так, при обследовании 454 индивидов и 280 пациентов контрольной группы было показано, что облучение малыми дозами радиации может быть фактором риска развития сердечной патологии: каротидного склероза (Boaventura et al.,

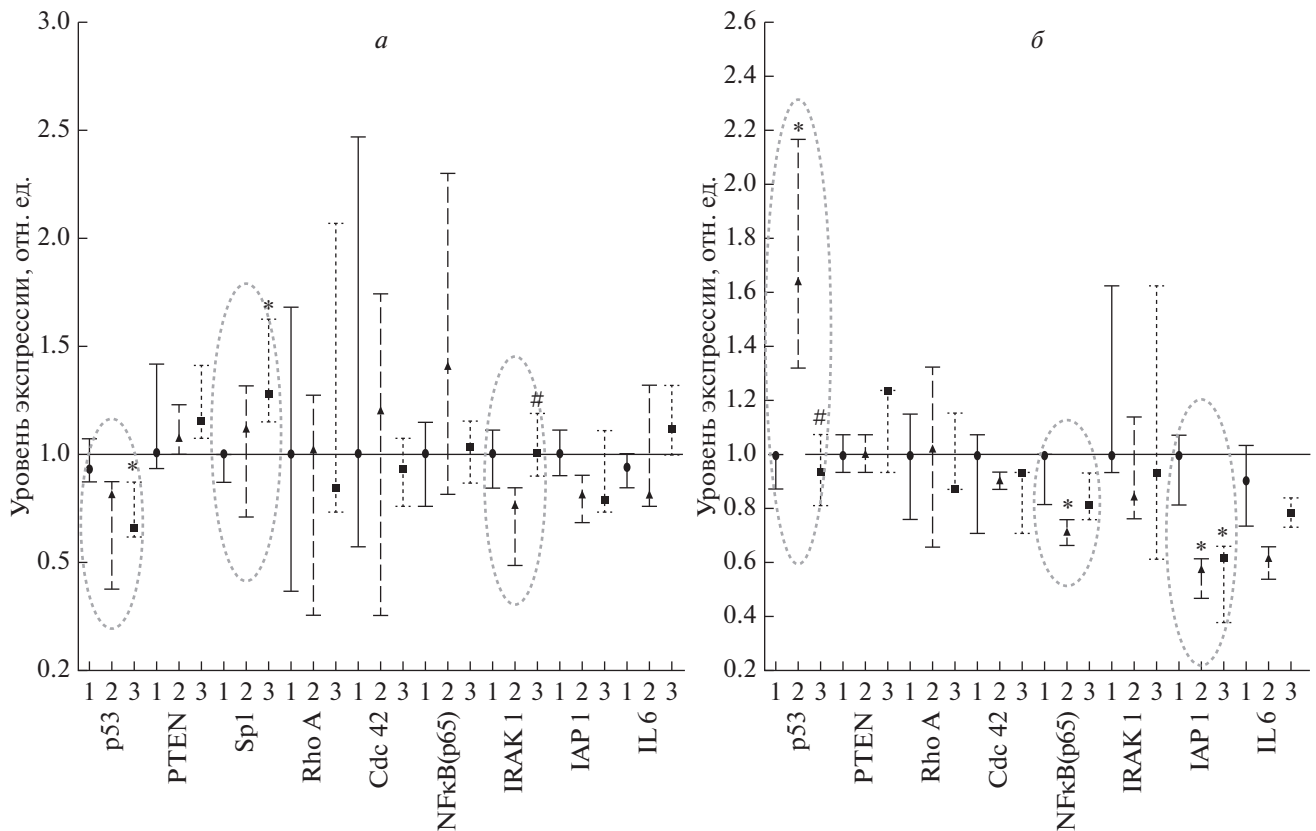


Рис. 2. Изменение содержания мРНК белок-кодирующих генов в клетках линии Jurkat (*а*) и нормальных лимфоцитах (*б*) в контроле (1) и через 20 ч после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия в дозе 0.1 Гр а затем (через 4 ч) 5 Гр (3). Объяснения к рис. 2–4: данные представлены в виде медиан и квартилей. Значения медианы в контрольных группах приняты за 1, а значения медианы в экспериментальных группах показывают во сколько раз через 20 ч после облучения клеток уровень экспрессии гена выше или ниже относительно контрольной группы. Различия статистически значимы * между интактным контролем и облученными клетками и # между группами (0.1 Гр + 5 Гр) и 5 Гр ($P < 0.05$). Овалом выделены результаты у показателей, имеющих статистически значимые различия между исследуемыми группами.

2018). Малые дозы радиации также могут вызывать депрессии у людей (Yen et al., 2014).

С другой стороны, действие малых доз радиации создает резистентность к высоким дозам радиации — АО, который характерен для разных форм живого и может регистрироваться по ряду критериев: выживаемость, генные мутации, микроядерный тест и др. (Засухина, 2008, 2017; Серебряный, 2015; Пелевина и др., 2017). Отсутствие АО в злокачественных клетках показывает возможность применения малых доз радиации для оптимизации лучевой терапии. В этих условиях ряд авторов предлагает использовать малые дозы радиации для стабилизации нормальных, окружающих опухоль тканей при лечении онкобольных с последующим применением больших доз (Tang, Loke, 2015; Yang et al., 2016a).

Экспрессия генов и некодирующих РНК в злокачественных клетках может рассматриваться как показатель “молекулярного патогенеза”, а патологии в изменении этих показателей в ответ на действие ма-

лых и больших доз радиации могут служить определенным маркером прогноза эффективности терапии, а также риска возникновения радиоиндуцированных осложнений при лечении.

Выбор генов и некодирующих РНК в качестве таких показателей был обусловлен данными из литературы и собственных исследований при радиоответе (Шуленина и др., 2017). При этом нами показано, что АО формировался (по показателю выживаемости) в лимфоцитах нормальных клеток (различие между адаптивной и повреждающей дозой почти в 200 раз), тогда как в клетках Jurkat (с мутантным геномом) — нет. Анализ экспрессии генов (*P53*, *PTEN*, *RhoA*, *Cdc42*, *NFκB*, *IAP1*, *Il6*, *IRAK1*) показал достоверность изменений. Различия в изменении экспрессии между нормальными и злокачественными клетками были показаны для генов, находящихся под контролем факторов P53 и NFκB.

Особый интерес представляет исследование регуляторных РНК. Биоинформационный анализ пока-

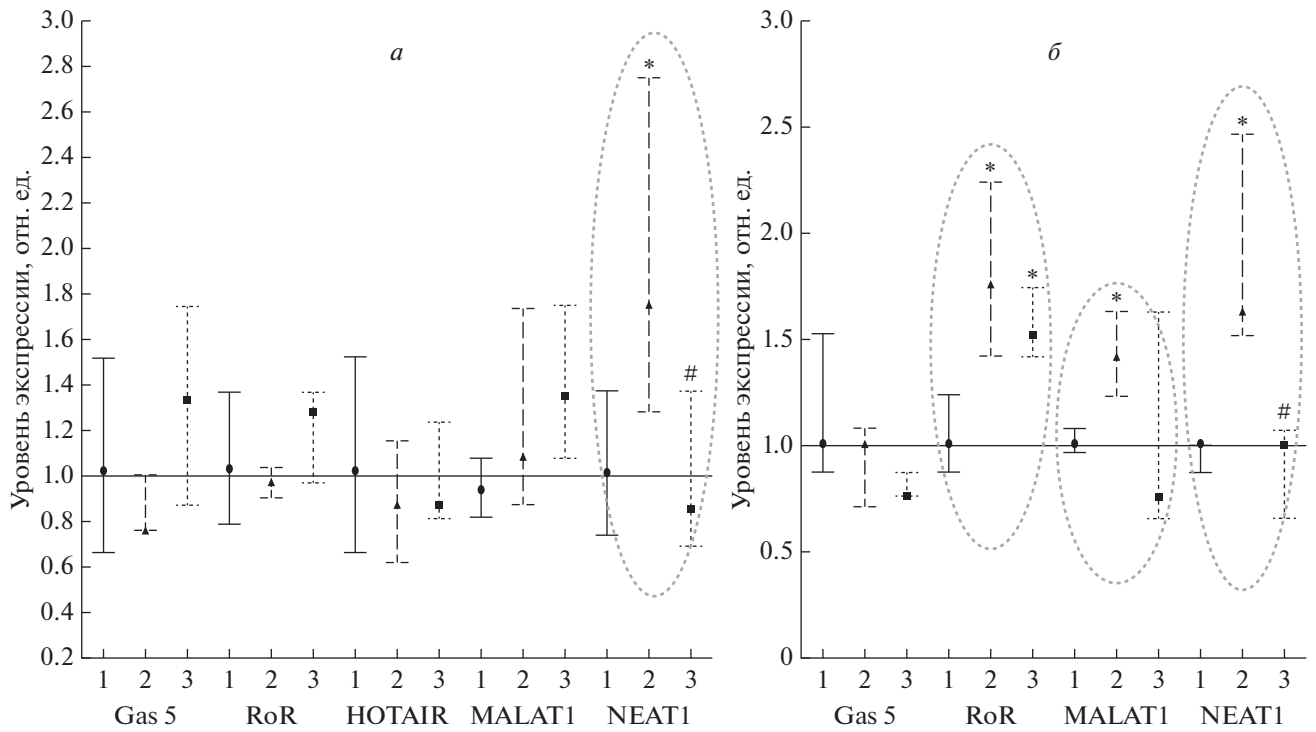


Рис. 3. Изменение содержания днРНК в клетках линии Jurkat (а) и нормальных лимфоцитах (б) в контроле (1) и через 20 ч после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия 0.1 Гр, а затем (через 4) ч 5 Гр (3). Объяснения те же, что к рис. 2.

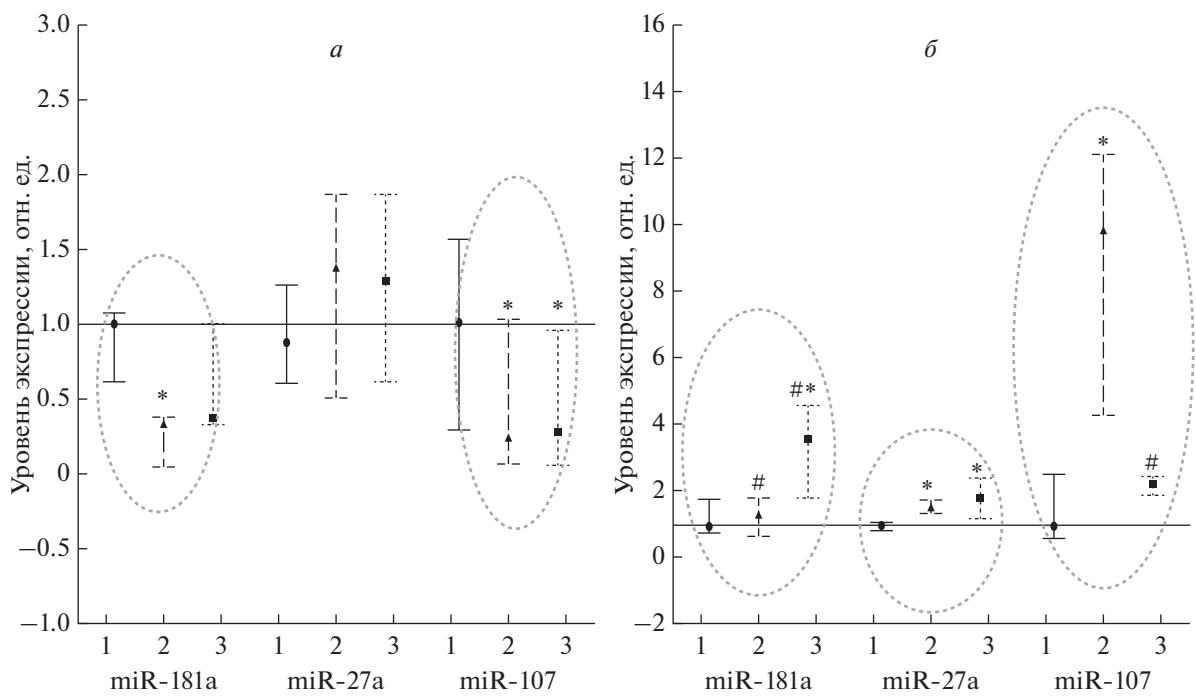


Рис. 4. Изменение содержания зрелых miR в клетках линии Jurkat (а) и нормальных лимфоцитах (б) в контроле (1) и через 20 ч после воздействия радиации в дозе 5 Гр (2), либо после адаптивного действия 0.1 Гр и через 4 ч – 5 Гр (3). Объяснения те же, что к рис. 2.

зывает, что для большинства miR существуют десятки мРНК, взаимодействие с которыми приводит к ингибированию экспрессии генов-мишеней. Реально в зависимости от типа клеток и тканей, а также с учетом действия различных экзогенных факторов, в клетке miR взаимодействует и ингибирует лишь часть имеющихся мишеней мРНК. После воздействия малых доз радиации в лимфоцитах может происходить не только обнаруженное нами изменение содержания зрелых miR-27a и miR-181a, но и их воздействие на мРНК-мишени других генов, что может отражаться на радиорезистентности клеток. В последнее время возлагаются большие надежды на исследование днРНК, как потенциальных диагностических и прогностических маркеров развития различных патологий. Обнаруженное нами увеличение содержания днРНК Gas5 в лимфоцитах при формировании АО позволяет надеяться, что расширение спектра исследуемых нами днРНК, позволит выявить комплекс показателей, характеризующих способность клеток к АО.

Различия в радиоответе нормальных и лейкозных клеток может рассматриваться с точки зрения защиты нормальных клеток, окружающих опухоль. При этом, малые дозы радиации создают устойчивость к высоким дозам радиации в нормальных клетках, не влияя на злокачественные клетки. Таким путем большие дозы радиации при радиотерапии будут повреждать нормальные клетки в меньшей степени, что снизит риск развития различных ранних осложнений: циститы, ректиты при лучевой терапии рака простаты и т.п. Ранее нами было показано, что показателем развития цистита при радиотерапии рака предстательной железы может служить повышение экспрессии miR-21, которая была высокой и до начала лучевой терапии и после развития осложнений, что делает возможным прогноз развития этой патологии. Содержание ряда других miR (-34a, -125b, Let-7a, -145, -16z) в крови этих пациентов до и после радиотерапии не изменялось (Шуленина и др., 2017).

Полученные результаты подтверждают, что АО часто не формируется в опухолевых клетках. Это может быть использовано для оптимизации лучевой терапии при предварительном облучении малой дозой радиации, которая формирует повышенную резистентность окружающих опухоль нормальных тканей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (госзадание № 0112-2019-0002).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинской

Декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Засухина Г.Д. 2008. Адаптивный ответ – общебиологическая закономерность: факты, гипотезы, вопросы. Радиационная биология. Радиоэкология. 48(4) : 464–473. (Zasukhina G.D. 2008. Adaptive response – biological tendency: Facts, hypothesis, questions. Radiats. Biol. Radioecol. 48(4) : 464–473.)
- Засухина Г.Д., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Васильева И.М. 2017. Роль некодирующих РНК в клетках человека после воздействия ионизирующей радиации. Цитология. 59(9) : 563–573. (Zasukhina G.D., Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Vasilyeva I.M. 2017. Role of non-coding RNA in human cells after radiation exposure. Tsitologiya. 59(9) : 563–573.)
- Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Васильева И.М., Салеева Д.В., Засухина Г.Д. 2018. Некоторые аспекты канцерогенеза, связанные с генетическими и эпигенетическими факторами. Успехи совр. биол. 138(5) : 427–445. (Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Vasilyeva I.M., Saleeva D.V., Zasukhina G.D. 2018. Some Aspects of Carcinogenesis Related to Genetic and Epigenetic Factors. Biol. Bull. Rev. (Adv. Modern Biol.) 138(5) : 427–445.)
- Пелевина И.И., Алещенко А.В., Антошина М.М., Бирюков В.А., Воробьева Н.Ю., Карякин О.Б., Китторова О.В., Минаева Н.Г., Серебряный А.М. 2017. О некоторых путях формирования радиационно-индуцированного адаптивного ответа. Радиационная биология. Радиоэкология. 57(6) : 565–572. (Pelevina I.I., Aleshchenko A.V., Antoshchina M.M., Biriukov V.A., Vorobyeva N.Yu., Karyakin O.B., Kittorova O.B., Minaeva N.G., Serebryanyi A.M. 2017. About some ways of radio-adaptive response formation. Radiats. Biol. Radioecol. 57(6) : 565–572.)
- Серебряный А.М. 2015. О множественности механизмов формирования радиоадаптивного ответа у лимфоцитов периферической крови человека. Цитология. 57(5) : 319–329. (Serebryanyi A.M. 2015. On the plurality of the ways of radiation adaptive response formation in human peripheral blood lymphocytes. Tsitologiya. 57(5) : 319–329.)
- Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. 2017. МикроРНК в крови пациентов с раком предстательной железы как возможный показатель ранних осложнений лучевой терапии. Радиационная биология. Радиоэкология. 57(6) : 598–607. (Shulenina L.V., Mikhailov V.F., Raeva N.F., Saleeva D.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D. 2017. MicroRNA in the blood of prostate cancer patients as a possible indicator of development of early complications of radiotherapy. Radiats. Biol. Radioecol. 57(6) : 598–607.)
- Adriaens C., Standaert L., Barra J., Latil M., Verfaillie A., Kalev P., Boeckx B., Wijnhoven P.W.G., Radaelli E., Vermi W., Leucci E., Lapoue G., Beck B., van den Oord J., Nakagawa S., Hirose T., Sablina A.A., Lambrechts D., Aerts S., Blanpain C., Marin J.-C. 2016. P53 induces formation of NEAT1 lncRNA-

- containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nature Medicine*. 22 : 861–868.
- Ahmed K.M., Nantajit D., Fan M., Murley J.S., Grdina D.J., Li J.J. 2009. Coactivation of ATM/ERK/NF-kappaB in the low-dose radiation-induced radioadaptive response in human skin keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 46 : 1543–1550.
- Bae S., Kim K., Cha H.J., Choi Y., Shin S.H., An I.S., Lee J.H., Lee S.J., Kim J.Y., Nam S.Y., An S. 2015. Low-dose γ -irradiation induces dual radio-adaptive responses depending on the post-irradiation time by altering microRNA expression profiles in normal human dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 35 : 227–237.
- Boaventura P., Durães C., Mendes A., Costa N.R., Chora I., Ferreira S., Araújo E., Lopes P., Rosa G., Marques P., Tavares S., Chaves V., Bettencourt P., Oliveira I., Costa F., Ramos I., Teles M.J., Guimarães J.T., Soares P. 2018. Is low-dose radiation exposure a risk factor for atherosclerosis disease? *Radiat. Res.* 189 : 418–424.
- Boominathan L. 2010. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One*. 5 : e10615.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010615>
- Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P., Junta C.M., Donadi E.A., Passos G.A., Sakamoto-Hojo E.T. 2007. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated *in vitro* with low doses of gamma rays. *Radiat. Res.* 168 : 650–665.
- Gandhi N. 2018. Cellular adaptive response and regulation of HIF after low dose gamma-radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 94 : 809–814.
- Gioia L., Siddique A., Head S.R., Salomon D.R., Su A.I. 2018. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*. 19 : 334.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>
- Grossi E., Sánchez Y., Huarte M. 2016. Expanding the p53 regulatory network: lncRNAs take up the challenge. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regulatory Mechanisms*. 1859 : 200–208.
- Gruel G., Voisin P., Vaurijoux A., Roch-Lefevre S., Gregoire E., Maltere P., Petat C., Gidrol X., Voisin P., Roy L., 2008. Broad modulation of gene expression in CD4+ lymphocyte subpopulations in response to low doses of ionizing radiation. *Radiat. Res.* 170 : 335–344.
- Hennesy E. J., Sheedy F. J., Santamaria D., Barbacid M., O'Neill L. A. 2011. Toll-like Receptor-4 (TLR4) Downregulates MicroRNA-107, Increasing Macrophage Adhesion via Cyclin-dependent Kinase 6. *J. Biol. Chem.* 286 : 25531–25539.
- Jiang H., Xu Y., Li W., Ma K., Cai L., Wang G. 2008. Low-dose radiation does not induce proliferation in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Radiat. Res.* 170 : 477–487.
- Kawamura K., Qi F., Kobayashi J. 2018. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. *J. Radiat. Res.* 59 (Suppl. 2).
<https://doi.org/10.1093/jrr/rrx091>
- Komova O., Krasavin E., Nasonova E., Mel'nikova L., Shmakova N., Cunha M., Testa E., Beuve M. 2018. Relationship between radioadaptive response and individual radiosensitivity to low doses of gamma radiation: An extended study of chromosome damage in blood lymphocytes of three donors. *Int. J. Radiat. Biol.* 94 : 54–61.
- Luo Z., Cui R., Tili E., Croce C. 2018. Friend or foe: MicroRNAs in the p53 network. *Cancer Letters*. 419 : 96–102.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.013>
- Maqbool R., Lone S. N., Ul Hussain M. 2016. Post-transcriptional regulation of the tumor suppressor p53 by a novel miR-27a, with implications during hypoxia and tumorigenesis. *Biochem. J.* 473 : 3597–3610.
- O'Leary V.B., Ovsepian S.V., Carrascosa L.G., Buske F.A., Radulovic V., Niyazi M., Moertl S., Trau M., Atkinson M.J., Anastasov N. 2015. PARTICLE, a Triplex-Forming Long ncRNA, Regulates Locus-Specific Methylation in Response to Low-Dose Irradiation. *Cell Reports*. 11 : 474–485.
- Oppenheim A., Lahav G. 2017. The puzzling interplay between p53 and Sp1. *Aging (Albany NY)*. 9 : 1355–1356.
- Pajic J., Rovcanin B., Kekic D., Jovicic D., Milovanovic A.P.S. 2018. The influence of redox status on inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 94 : 569–575.
- Raut S.K., Singh G.B., Rastogi B., Saikia U.N., Mittal A., Dogra N., Prasad R., Khullar M. 2016. miR-30c and miR-181a synergistically modulate p53–p21 pathway in diabetes induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 417 : 191–203.
- Shelke S., Das B. 2015. Dose response and adaptive response of non-homologous end joining repair genes and proteins in resting human peripheral blood mononuclear cells exposed to gamma radiation. *Mutagenesis*. 30 : 365–379.
- Tang F.R., Loke W.R. 2015. Molecular mechanisms of low dose radiation-induced hormesis, adaptive response, radio resistance, bystander effects and genomic instability. *Int. J. Radiat. Biol.* 91 : 13–27.
- Tapio S., Jacob V. 2007. Radioadaptive response revisited. *Radiat. Environ Biophys.* 46 : 1–12.
- Yang G., Li W., Jiang H., Liang X., Zhao Y., Yu D., Zhou L., Wang G., Tian H., Han F., Cai L., Cui J. 2016a. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics. *Int. J. Cancer*. 139 : 2157–2168.
- Yang G., Yu D., Li W., Zhao Y., Wen X., Liang X., Zhang X., Zhou L., Hu J., Niu C., Tian H., Han F., Chen X., Dong L., Cai L., Cui J. 2016b. Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget*. 7 : 71856–71872.
- Yen P.N., Lin I.F., Chang W.P., Wang J.D., Chang T.C., Kuo K.L., Hwang J.S., Liu I.C., Chen Y.T., Yang C.C. 2014. Risk factors of depression after prolonged low-dose environmental radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 90 : 859–866.
- Yuan D., Pan Y., Zhang J., Shao C. 2010. Role of nuclear factor-kappaB and P53 in radioadaptive response in Chang live cells. *Mutat. Res.* 688 : 66–71.
- Zhang A., Xu M., Mo Y.-Y. 2014. Role of the lncRNA–p53 regulatory network in cancer. *J. Mol. Cell Biol.* 6 : 181–191.

THE EFFECT OF LOW DOSES OF IONIZING RADIATION ON THE EXPRESSION OF GENES AND NON-CODING RNA IN NORMAL AND MALIGNANT HUMAN CELLS

V. F. Mikhailov^{a, *}, L. V. Shulenina^a, N. F. Raeva^a, I. M. Vasilieva^b, D. V. Saleeva^a,
M. V. Neznanova^a, and G. D. Zasukhina^{b, **}

^a*Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, 123098 Russia*

^b*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: vfmi@mail.ru*

***e-mail: Zasukhina@vigg.ru*

The effect of X-ray radiation (0.1 Gy) on the expression of a number of genes and regulatory RNA (miRNA and long non-coding RNA) in human lymphocytes and T-lymphoblastic cells (Jurkat line) was studied. After 1 h after the action of a low dose of radiation, lymphocytes showed activation of P53 expression and a decrease in the level of mature miR-27a and miR-181a, having as a target mRNA of the P53 gene, as well as inhibition of NFκB activity, tested to reduce the mRNA content of RHO-A genes, cdc42 and IL6. By 4 h, normalization of the parameters was observed. In contrast, an increase in the content of the mRNA of the NFκB(p65) gene and the mRNA of its IL6 gene target was noted in the Jurkat cell line during this period. The repeated irradiation of cells at a dose of 5 Gy carried out after 4 h showed the presence of a radiation adaptive response (AR) according to the criterion of survival in lymphocytes and its absence in Jurkat cells. The survivors after 20 hours of lymphocytes for the differences between the groups of 5 Gy and (0.1 Gy + 5 Gy) revealed indicators characteristic of AR (mRNA of the P53 gene, NEAT1, miR-181a, miR-107). The results indicate the activation of various intracellular systems after the stress of low doses of radiation on lymphocytes and Jurkat cells. This approach can be used to optimize the efficacy of radiation therapy when pre-irradiated with a low dose of radiation, which increases the radioresistance of normal tissues surrounding a tumor.

Keywords: radiation adaptive response, long non-coding RNA, small doses of ionizing radiation, miRNA, NFκB, P53