

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК: ИССЛЕДОВАНИЯ *in vitro* И *in vivo*

© 2020 г. Н. С. Кузьмина*

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

*E-mail: nin-kuzmin@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2020 г.

После доработки 01.06.2020 г.

Принята к публикации 11.06.2020 г.

Рассматриваются феноменологические аспекты и механизмы нарушений метилирования ДНК (изменения тотального уровня метилирования ДНК и повторяющихся элементов генома, локус-специфические нарушения метилирования, потеря импринтинга), индуцированных радиацией в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, а также в организме человека. Приведены результаты оценки связи радиочувствительности опухолевых клеток с их эпигенетическим статусом. Хотя установлено, что радиорезистентный фенотип таких клеток ассоциирован с гиперметилованием промоторов множества генов, механизм этого феномена очень сложный и требуется таргетное воздействие на метилирование, чтобы увеличить повреждаемость опухолевых клеток, приводящую их к гибели. Выявлена сопряженность индуцированных изменений в метилировании ДНК с проявлениями таких немишеных эффектов радиации, как геномная нестабильность и эффект “свидетеля”. Обсуждается потенциальная значимость изучения изменений метилирования ДНК у облученных лиц с целью выявления индивидов с преждевременным старением и повышенным риском развития возраст-ассоциированной патологии.

Ключевые слова: радиация, исследования *in vitro* и *in vivo*, гипер-/гипометилирование ДНК, CpG-островок, преждевременное старение

DOI: 10.31857/S0869803120050070

Интенсивное развитие атомной энергетики, науки и ядерной медицины приводит к росту числа людей, подвергающихся воздействию радиационного фактора в процессе профессиональной деятельности, диагностических и лечебных мероприятий, а также в результате техногенных аварий на объектах, использующих источники ионизирующих излучений. Учитывая постулированное в радиобиологии ускоренное старение, индуцированное облучением [1], все эти контингенты лиц относятся к группе риска по преждевременной манифестации возраст-ассоциированных заболеваний. Однако разработка системы превентивной диагностики этих патологий имеет ряд сложностей. Во-первых, сами по себе результаты широкогеномных исследований (GWAS — Genome Wide Association Studies), а именно анализ совокупности аллельных вариантов для множества “топовых” SNP-единичных нуклеотидных замен, проявивших каждый в отдельности связь с риском развития той или иной патологии, к сожалению, объясняет, как правило, менее 10% наблюдаемой наследуемости ряда мультифакториальных заболеваний, в том числе ассоциированных с возрастом (злокачественные новообра-

зования, сахарный диабет 2-го типа, сердечно-сосудистые заболевания и др.) [2, 3]. Во-вторых, общеизвестны мишеные и немишеные гентоксические эффекты радиации, наблюдаемые в отдаленный период после облучения организма [4–9]. И хотя однозначно ясно, что повреждения генома не могут не сказаться на функции клетки и организма в целом, отсутствуют явные доказательства их связи с индукцией тех или иных возрастных патологий [10]. В то же время последние достижения в области эпигенетики старения и возраст-ассоциированных заболеваний, связанные с разработкой высокозначимой модели оценки биологического возраста индивида [11–15], позволяющей выявлять лиц с преждевременным старением, дают надежду на решение вышеизложенной проблемы. Поэтому изучение закономерностей индукции эпигенетических изменений в организме, подвергшемся радиационному воздействию, является важным и актуальным аспектом оценки отдаленных последствий облучения.

В данной статье рассматриваются феноменологические аспекты и механизмы нарушений метилирования ДНК — ключевой эпигенетической модификации генома, индуцированных радиаци-

ей в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, а также в организме человека. Приведены результаты оценки связи радиочувствительности опухолевых клеток с их эпигенетическим статусом. Рассмотрена сопряженность индуцированных изменений в метилировании ДНК с проявлениями таких немимических эффектов радиации, как геномная нестабильность и эффект “свидетеля”. Обсуждается потенциальная значимость изучения нарушений метилирования ДНК у облученных лиц с целью выявления индивидов с преждевременным старением и повышенным риском развития возраст-ассоциированной патологии.

ДНК-МЕТИЛИРОВАНИЕ КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА

Сайты метилирования. Как известно, ДНК-метилирование – эпигенетическая модификация генома, играющая ключевую роль в регуляции многих биологических процессов [16–18]. Сайтами метилирования ДНК в геноме человека являются, преимущественно, CpG-динуклеотиды. За счет того, что 5-метилцитозин склонен к реакции деаминарования с образованием тимина, цитозин характеризуется высокой частотой мутирования в CpG-контексте (CG>TG), а наиболее распространенный однонуклеотидный полиморфизм в геноме человека – это замена цитозина на тимин (C>T). Так, эволюционно сложилось, что наблюдаемая частота CpG-динуклеотидов в несколько раз ниже ожидаемой [19, 20]. В геноме человека 5-метилцитозин составляет около 1% всех нуклеотидов в ДНК, а метилированное состояние характерно для 70% CpG-динуклеотидов. Большинство метилированных цитозинов локализовано в диспергированных (*LTR*, *LINE*, *SINE*, *Alu*) и tandemных повторах (сателлитная ДНК), которые составляют, по крайней мере, половину человеческого генома. Такое эпигенетическое маркирование защищает геном от инсерционного мутагенеза и рекомбинаций ДНК [16, 21–24].

CpG-островки. Неметилированные CpG-динуклеотиды представлены, в основном, в CpG-островках, и приблизительно 60% этих элементов генома ассоциированы с промоторами генов, абсолютное большинство которых постоянно экспрессируются (гены “домашнего хозяйства”). Остальные 40% CpG-островков удалены от сайтов старта транскрипции, являются внутригенными или межгенными и называются “орфанные CpG-островки”, так как они не ассоциированы с соответствующими промоторами, но выполняют похожие функции [16, 18]. В CpG-островках частота CpG-динуклеотидов в 7–10 раз выше (приблизительно 1 : 10–20), а уровень CG>TG почти в 7 раз ниже, чем в других регионах генома [24].

Следует подчеркнуть, что метилирование CpG-динуклеотидов промоторов генов сопряжено с подавлением транскрипции, но не элонгации. Внутригенные CpG-островки в большей степени подвержены метилированию, блокирующему использование альтернативных промоторов. Большая роль в регуляции экспрессии некодирующих РНК (нкРНК, англ. ncRNA), энхансерной активности, РНК процессинга (альтернативные сайты сплайсинга и полиаденилирования) отводится метилированию внутригенных CpG [25, 26].

Как правило, метилирование CpG-островков промоторов часто рассматривается как один из механизмов генного сайленсинга, опосредованного протеинами, содержащими метил-CpG-связывающий домен (MBD) или ассоциированное с изменением эффективности связывания позитивных и негативных факторов транскрипции (TFs) с их сайтами узнавания. Однако показано, что отсутствие метилирования не обязательно сопряжено с активным состоянием гена, а подавление экспрессии локуса может быть обеспечено другими эпигенетическими механизмами [25].

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ НАРУШЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Экспериментальные исследования in vitro

Изменения тотального уровня метилирования ДНК. Еще в 70–80-е годы прошлого столетия были получены первые экспериментальные данные, свидетельствующие о реальности индукции радиацией изменений метилирования генома, зарегистрированных при оценке тотального уровня 5-метилцитозина. Так, показано, что воздействие на *Escherichia coli* 15T⁻ (555-7) УФ-света и рентгеновского излучения приводит к увеличению метилирования вновь синтезируемой ДНК (метод основан на включении L-methyl-³H methionine в новосинтезированную ДНК) на 25 и 15% соответственно, при этом дополнительное включение метильных групп или деметилирование родительской ДНК отсутствует [27]. Воздействие γ -излучения ⁶⁰Co в дозах 0.5–10 Гр на клетки четырех линий (Chinese Hamster Ovary – CHO, Chinese hamster lung fibroblasts – V79A03, human HeLa – S-3, клетки мышины нейробластомы – C-1300N1E-115) приводило к глобальному гипометилированию ДНК, выявляемому через 24, 48 и 72 ч после облучения (метод высокоэффективной жидкостной хроматографии – HPLC). Выявленная эпигенетическая модификация сопровождалась снижением активности ДНК-метилтрансфераз [28]. Однако изменения метилирования не выявлены в эксперименте других исследователей, а именно, при воздействии рентгеновского излучения (10 Гр) на мышинные эмбриональные клетки ли-

нии m5S/1M и на клетки китайского хомячка CHO/K1 [29].

Проведено изучение изменений паттерна метилирования после воздействия X-лучей (2 Гр) на лимфобластоидные клетки человека радиочувствительной ТК6 (нормальный генотип по гену *p53*) и радиорезистентной WTK1 (мутантный генотип по гену *p53*, высокая эффективность рекомбинационной репарации) линий. Исходный уровень 5-метилцитозина был выше в WTK1 клетках по сравнению с ТК6 клетками. В обеих клеточных линиях выявлено радиационно-индуцированное гипометилирование генома в первые 2–8 ч после облучения (иммуноферментный метод ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). В целом в радиорезистентных клетках эффекты гипометилирования и снижения экспрессии генов метилтрансфераз *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, индуцированные облучением, были более выражены. Транскрипция *TET1* гена, кодирующего фермент, конвертирующий 5-метилцитозин геномной ДНК в 5-гидроксиметилцитозин (стадия деметилирования ДНК), была существенно повышена через 24 ч после радиационного воздействия в обеих клеточных линиях, однако наибольший эффект наблюдался для ТК6 клеток [30].

Еще ранее было показано, что *p53* участвует в эпигенетической регуляции генома. В частности, выявлено, что *p53*, формируя комплекс с Sp1 и модификаторами хроматина в области промотора гена *DNMT1*, приводит к репрессии этого локуса [31]. Выявлено, что делеция *p53* приводит к увеличению транскрипции мРНК *DNMT1* локуса [32]. Кроме того, показано, что *p53* приводит к супрессии гена гистоновой метилтрансферазы *EZH2* [33]. Считается, что *p53* контролирует экспрессию *DNMT1* через прямое связывание с ДНК. Воздействие ионизирующей радиации ослабляет это связывание, приводя к увеличению уровня *DNMT1* [32].

Показано, что облучение нормальных фибробластов человека в дозах 2 и 4 Гр (X-лучи) приводит к статистически незначимому снижению общего уровня метилированных цитозинов (метод ELISA) через 6 ч после воздействия. Существенные различия ($p = 0.04$) обнаруживались только через 24 ч после воздействия облучения на клетки в дозе 2 Гр [34].

Изменения метилирования повторяющихся элементов ДНК. Так как диспергированные и tandemные повторы составляют, по крайней мере, половину генома человека, их эпигенетический статус часто рассматривают как показатель тотального метилирования генома. Так, в уже упомянутой работе [34] не выявлено (бисульфитное пиросеквенирование) значимых различий между уровнями метилирования *LINE-1*, а также центромержной α -сателлитной ДНК, в облученных

(X-лучи, 2 и 4 Гр) и необлученных нормальных фибробластах человека. Только уровень метилирования *ALU* повторов возрастал ($p = 0.01$) через 6 ч после радиационного воздействия в дозе 4 Гр. Кроме того, поклеточный анализ эпигенома не выявил повышенной вариабельности метилирования повторов в облученных клетках по сравнению с интактными.

При фракционированном воздействии γ -излучения ^{137}Cs в суммарной дозе 10 и 20 Гр (1–2 нед, 5 фракций в неделю по 2 Гр) на клетки рака молочной железы (линия MCF7) не выявлено (масс-спектрометрия) статистически значимых различий в уровне метилирования повторов (*LINE-1*, *Alu*, *LTR*, сателлитная ДНК) в облученных и необлученных клетках, а восстановление способности клеток к делению (14 дней после облучения) не сопровождалось снижением общего уровня метилирования ДНК [35].

Локус-специфические изменения метилирования ДНК. Выявлено (комбинация методов MIRA – methylated-CpG island recovery assay и microarray) незначительное количество изменений в метилировании генома нормальных клеток человека (фибробластов HFBs и клеток бронхиального эпителия NHBEc) через 7 дней после острого воздействия γ -излучения ^{137}Cs в дозах 0.1–4 Гр. Однако наиболее выраженные радиационно-индуцированные модификации генов *CLEC18A*, *SDHALP1*, *ZCCHC16* в фибробластах, а также локусов *MBP*, *CLEC18C* и Y-хромосомного региона в клетках бронхиального эпителия не были подтверждены методами COBRA и бисульфитным секвенированием. Авторы отмечают, что рассматриваемые изменения, вероятно, имеют место на уровне отдельных CpG-динуклеотидов анализируемого участка генома и/или затрагивают только малую фракцию клеточной популяции. Однозначно, в данной работе не показана индукция механизмов (например, инициация сигнальных каскадов), которые приводят к генерализованным изменениям ДНК-метилирования, представляющим собой ответ клетки на облучение [36].

Кроме того, широкогеномное изучение паттерна метилирования (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) не выявило значимых изменений изучаемых эпигенетических показателей в облученных фибробластах (X-лучи, 2 и 4 Гр) по сравнению с необлученными клетками, причем результат не зависел от области расположения CpG-сайта (промотор, 5'UTR, 3'UTR, экзоны, интроны, межгенные участки ДНК). Таким образом, показано, что, по крайней мере в ранней фазе (в пределах первого клеточного цикла после облучения), ответ нормальных клеток на облучение не ассоциирован с изменением паттерна метилирования [34].

В другом широкогеномном исследовании метилома (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) клеток

бронхиального эпителия человека показано, что воздействие на них такой радиации, как тяжелые ионы ^{56}Fe (170 keV/ μm , 0.1–1.0 Гр) и ^{28}Si (70 keV/ μm , 0.3–1.0 Гр), рентгеновское излучение (2 keV/ μm , 1.0 Гр) приводит к индукции изменений метилирования генома, регистрируемых не только через 2 дня после воздействия, но и спустя 50 сут. Отмечено, что сайты, характеризующиеся дозозависимым изменением эпигенетического статуса, преимущественно гиперметируются при воздействии ^{56}Fe и ассоциированы с открытым хроматином (энхансеры, промоторы, берега CpG-островков), ^{28}Si в равной степени вызывает как гипер-, так и гипометилирование сайтов в более репрессированном хроматине, а X-лучи в большей степени приводят к гипометилированию, затрагивая транскрибируемую область гена и межгенные промежутки. Причем эффекты, индуцируемые при воздействии ^{56}Fe , ^{28}Si и рентгеновских лучей наблюдались соответственно в сайтах, изначально характеризующихся низким, промежуточным и высоким уровнями метилирования. Отмечено, что спектр CpG-динуклеотидов, модифицированных в результате воздействия ^{56}Fe , совпадает с таковым в клетках аденокарциномы и плоскоклеточного рака легких человека [37].

Частота гидроксиметилирования цитозинов, которое имело место преимущественно в облученных (X-лучи, 0.5 и 2 Гр) фибробластах легких (IMR90) по сравнению с необлученными клетками (метод иммунопреципитации + последующее секвенирование), возрастала с течением времени, прошедшего после облучения (от 1 до 120 ч), причем выраженность эффекта зависела от дозы облучения. Противоположная динамика отмечена для CpG-сайтов, расположенных в межгенных промежутках [38].

Таким образом, число исследований индуцированных облучением изменений метилирования нормальных (неопухолевых) клеток ограничено. Однако имеется гораздо большее количество экспериментальных работ, выполненных на опухолевых клетках, в том числе, посвященных изучению связи их радиочувствительности с эпигенетическим статусом, а также оценке эффективности воздействия ингибиторов метилирования ДНК в повышении чувствительности раковых клеток к облучению [39–41].

В широкогеномном исследовании (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) на раковых клетках молочной железы (линия MDA-MB-231), подвергшихся воздействию X-лучей в дозах 4 и 6 Гр и проанализированных через 1–72 ч после облучения, выявлены сотни дифференциально-метилованных генов, которые ассоциированы с клеточным циклом, ДНК репарацией, апоптозом. Измененный эпигенетический статус на протяжении всего эксперимента при облучении в дозах

2 и 6 Гр выявлен для 15 и 23 локусов соответственно. Выраженность рассматриваемых эпигенетических изменений зависела от дозы облучения и времени, прошедшем после воздействия радиации. Авторы отмечают, что в целом динамика метилирования согласуется с биологическим ответом клеток на повреждающее действие радиации и имеет не беспорядочный характер [42].

Другое широкогеномное исследование метилома (метил-ЦГ-иммунопреципитация + ДНК-микрочип методы) показало, что после фракционированного воздействия γ -излучения ^{137}Cs в суммарной дозе 10 и 20 Гр (1–2 нед, 5 фракций в неделю по 2 Гр) на клетки рака молочной железы (линия MCF7), 15 генов характеризовались измененным эпигенетическим статусом (сравнение с необлученными клетками этой линии). Однако только для четырех генов (*ADAMTS9*, *FOXCI*, *TRAPPC9*, *AMIGO3*) дифференциальный статус метилирования CpG-островков верифицировался масс-спектрометрическим анализом. В целом уровень рассматриваемой модификации первых трех генов возрастал на 15–18% после облучения, а для *AMIGO3* локуса выявлено его снижение на 18%. Спустя 14 дней после воздействия, т.е. время, за которое происходило восстановление клоногенной активности клеток при дозе 10 Гр, но не 20 Гр, уровни метилирования генов *FOXCI* и *TRAPPC9* были значительно снижены по сравнению с таковыми, имевшими место сразу после экспонирования, но существенно превышали рассматриваемые показатели в необлученных клетках. По мнению авторов, возобновление роста клеток после фракционированного облучения в дозе 10 Гр ассоциировано с локус-специфическими изменениями ДНК-метилирования, связанными с апоптотическим сигналингом [35].

Показано, что воздействие радиации в дозе 5 Гр на клетки колоректальной карциномы линий HCT116 и SW620 приводит к ослаблению связывания DNMT1 с промоторами генов *Fas* и *4-1BBL*, снижая их метилирование. Аналогичный эффект наблюдался при обработке клеток 5-азациитидином (5-Aza). Таким образом, модулируется экспрессия этих генов, делая опухолевые клетки более чувствительными к иммунной атаке, опосредованной T-лимфоцитами [43].

Показана сопряженность радиочувствительности опухолевых клеток с уровнем метилирования тех или иных генов [44]. Например, показано, что радиочувствительность U87 клеток глиомы с низким уровнем экспрессии ATM – ключевого сигнального компонента клетки, индуцирующегося в ответ на повреждение ДНК, в 2 раза превышает аналогичный показатель в T98G клетках глиомы, экспрессирующих ATM белок в нормальном количестве. При этом отмечено, что причиной такой низкой индукции ATM в этих радиочувстви-

тельных клетках является метилирование промотора, а снятие этого метилирования приводит к увеличению уровня АТМ протеина в клетках и уменьшению их радиочувствительности [45]. Гиперметилирование других генов, например, гена *SOCS1* супрессора цитокинового сигналинга-1 в клетках глиобластомы или гена смерти-ассоциированной протеинкиназы *DAPK* в клетках рака шейки матки было ассоциировано с повышенной радиорезистентностью опухолей [46, 47].

Широкогеномное изучение паттерна метилирования (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) в клетках опухолей головы и шеи (HNSCC) показало, что по сравнению с радиочувствительными клетками линии SCC-61, радиорезистентные клетки rSCC-61 имеют сотни дифференциально метилированных сайтов, которые являются, в основном, гиперметилированными. Причем показано, что в радиорезистентных клетках гиперметилированных сайтов в 10 раз больше, чем гипометилированных. Повышенный уровень фермента DNMT3B, но не DNMT1 и DNMT3A, обнаружен также в радиорезистентных клетках. После объединения этих результатов с таковыми по экспрессии генов выявлено 84 дифференциально метилированных и экспрессируемых локусов в этих двух клеточных линиях (гены сигналинга, ассоциированного с интегрин-связанными киназами ILK, глюкокортикоидными рецепторами, гены, связанные с окислением жирных кислот и регуляцией клеточного цикла). Например, ген белка CCND2, участвующего в регуляции клеточного цикла, был репрессирован в rSCC-61 клетках (в отличие от клеток SCC-61), что ассоциировано с его гиперметилированием в промоторном регионе. Кроме того, данные по гиперметилированию генома рассматриваемой радиорезистентной линии опухолевых клеток были подтверждены результатами анализа эпигенетического статуса (Cancer Genome Atlas) клеток опухолей, резецированных у HNSCC пациентов [48].

В другой работе, посвященной изучению эпигенетического контроля радиочувствительности клеток немелкоклеточного рака легких (NSCLC), выявлен 1091 дифференциально-метилированный локус (гены, вовлеченные в клеточную адгезию и коммуникации, сигнальную трансдукцию, регуляцию транскрипции) при анализе (ДНК-микрочип, Illumina 27 K) двух клеточных линий: радиочувствительной H460 и радиорезистентной H1299. Показано, что число гиперметилированных генов ($n = 747$) в H1299 клетках в 2 раза превышает таковой показатель в клетках H460 линии. Выявлено, что эпигенетический статус четырех генов, который существенно различался между клетками этих двух линий, что было подтверждено методом метил-специфической ПЦР, сопряжен с экспрессией локусов и чувствительностью клеток к радиационному воздействию.

Так, гипометилированные гены *SERPINB5* и *S100A6* (ингибиторы клеточной инвазии), активно экспрессирующиеся в радиочувствительной клеточной линии H460, были гиперметилированы и не транскрибировались в радиорезистентных H1299 клетках. При этом снижение экспрессии этих генов в экспериментах с малой интерферирующей РНК (siРНК, small interfering RNA) приводило к радиорезистентности, т.е. возрастанию выживаемости клеток H460 после γ -воздействия в дозах 5–8 Гр. Напротив, гены *CAT* (антиоксидантный фермент – каталаза) и *BNC1* (регулятор транскрипции) были гипометилированы в радиорезистентных клетках, а РНК-интерференция приводит к увеличению радиочувствительности [49].

При исследовании клеток плоскоклеточной карциномы гортани (бисульфитное пиросеквенирование) показано, что радиорезистентная линия RR-Нер-2 характеризуется повышенным (по сравнению с радиочувствительными клетками Нер-2) уровнем метилирования пяти генов (*TOPO2A*, *PLXDC2*, *ETNK2*, *GF11* и *IL12B*), которые были предварительно идентифицированы как сопряженные с данным фенотипом по базе маркерных экспрессирующихся последовательностей (EST, expressed sequence tag). Уровень ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B были также выше в RR-Нер-2 клетках по сравнению с таковыми в Нер-2 клетках [50].

Показано, что общий уровень метилирования ДНК (radiolabeled [3H] dCTP extension assay) в доксорубин-резистентных клетках аденокарциномы молочной железы (линия MCF-7/DOX) существенно ниже, чем таковой в клетках MCF-7, чувствительных к этому цитостатику. Различный эпигенетический статус клеток этих линий был сопряжен с дифференциальной клеточной чувствительностью к воздействию рентгеновского излучения в дозе 5 Гр. Так, облучение не приводило к индукции апоптоза клеток MCF-7/DOX, и, напротив, MCF-7 клетки были чувствительны к радиационно-индуцированному апоптозу. Значительное увеличение уровня метилирования в клетках (обе линии) являлось результатом их обработки (в течение 6 дней) S-аденозилметионином (SAM), являющимся донором метильных групп. Последующее облучение не приводило к изменению количества метилированных цитозинов в клетках, но при этом отмечены существенное возрастание радиочувствительности MCF-7/DOX клеток и ее снижение в изначально радиочувствительной MCF-7 линии. Авторы предполагают, что последнее связано с метилированием и последующим репрессированием некоторых апоптотических генов [51].

Показано, что резистентность к цитостатикам ассоциирована с повышенным уровнем детокси-

фикации свободных радикалов системой глутатиона, которая использует SAM как источник метильных групп для глутатион-S-трансфераз. Это приводит к истощению SAM в клетках, вызывая гипометилирование. Кроме того, известно, что “отдав” метильную группу, SAM превращается в SAH (S-аденозил-гомоцистеин), который обладает ингибирующим действием на активность ДНК-метилтрансфераз [52, 53].

Следует отметить, что гиперметилирование некоторых генов сопряжено не только с чувствительностью опухолевых клеток к облучению *in vitro*, но и имеет прогностическую значимость при радио-/химиотерапии опухолей. Например, гиперметилирование гена *MGMT* в клетках резецированной глиобластомы сопряжено с эффективностью последующей радиотерапии и выживаемостью пациентов [54]. Эта эпигенетическая модификация ассоциирована с высокой чувствительностью рассматриваемой опухоли к алкилирующему агенту кармустину, что ассоциировано с ее регрессией и длительной ремиссией болезни [55]. Аналогичный результат получен и в другом исследовании при анализе последствий лечения глиобластомы облучением в сочетании с темозоломидом с последующим адьювантным курсом этого препарата [56]. И напротив, гипометилирование *LINE-1* в клетках злокачественных опухолей ассоциировано, в большинстве случаев, с плохим прогнозом заболевания, неэффективностью радио- и химиотерапии, низкими показателями выживаемости пациентов [57].

В экспериментальных исследованиях *in vitro* показано, что воздействие (в течение 18–48 ч перед облучением) таких ингибиторов метилирования ДНК как зебуларин, псаммаплин, 5-аза-2'-дезоксидцитидин (5-аза-dC) на раковые клетки различных линий (панкреатическая карцинома, MiaPaCa; глиобластома, U251; карцинома простаты, DU145; глиобластома, U373MG; карцинома легких, A549; карцинома головы и шеи, HNSCC) приводит к возрастанию их радиочувствительности за счет накопления нерепарированных повреждений ДНК [58–60]. Наблюдаемый эффект подобен действию ингибиторов гистоновых деацетилаз (MS-275, вальпроевая кислота, LBH589, битулат), который наблюдался в экспериментах по оценке чувствительности к облучению *in vitro* опухолевых клеток различных линий и нормальных лимфоцитов человека при их предварительной обработке этими соединениями, приводящей к гиперацетилированию гистонов и релаксации хроматина [61–64].

В другой работе продемонстрировано, что вызванное 5-аза-dC повышение радиочувствительности клеток рака желудка (OCUM-2M, OCUM-12, MKN-45 линии) связано с G2-M арестом, а также апоптотической гибелью клеток, что сопровож-

далось повышенной экспрессией *p53*, *RASSF1* и *DAPK* семейства генов. Отсутствие рассматриваемого эффекта для клеток линий KATO-III и MKN-74 было ассоциировано с наличием мутации гена *p53* [65]. Показано, что псаммаплин А оказывает цитотоксическое действие на клетки карциномы эндометрия через селективную индукцию апоптоз-связанных генов [66]. Продемонстрировано, что 5-аза-dC может индуцировать G2-M арест и апоптоз в клетках остеосаркомы некоторых линий (SaOS2, HOS и U2OS) *p53*-независимым способом [67], что наблюдалось и в другом исследовании с децитабином [68]. Показано, что предобработка клеток назофарингеальной карциномы линий CNE2 и SUNE1 5-Аза за 24 ч до облучения (X-лучи, 2 Гр) приводит к существенному возрастанию их радиочувствительности за счет повышения уровня апоптотической гибели клеток, но не влияет на течение клеточного цикла и репарацию двунитевых разрывов ДНК [69].

В то же время предобработка радиорезистентных клеток карциномы головы и шеи rSCC-61 5-Аза не приводила к повышению радиационно-индуцированной клеточной гибели и количеству поврежденных ДНК (фосфорилированные γ -H2AX фокусы). Ранее эти же авторы показали повышенную пролиферативную активность rSCC-61 клеток по сравнению с SCC-61 клетками и G2/M – арест SCC-61 клеток в ответ на радиационное воздействие [70, 71].

Таким образом, наличие эффекта повышения радиочувствительности опухолевых клеток в эксперименте *in vitro* путем предварительной их обработки ингибиторами ДНК-метилтрансфераз, а также механизм реализации этого феномена зависят от типа клеток, использованного деметилирующего соединения, его концентрации, схемы эксперимента [69]. Хотя установлено, что, как правило, радиорезистентный фенотип опухолевых клеток ассоциирован с гиперметилированием промоторов множества генов (клеточного цикла и апоптоза, ингибиторов клеточной инвазии и др.), механизм этого феномена очень сложный и требуется таргетное воздействие на метилирование, чтобы увеличить повреждаемость опухолевых клеток, приводящую их к гибели.

Радиационно-индуцированные изменения метилирования ДНК в потомках облученных клеток. Имеются работы, свидетельствующие об изменении профиля метилирования в отдаленных потомках облученных клеток. Так, воздействие X-лучей (2 Гр) и ионов ^{56}Fe (1 Гр) на гибридные GM10115 клетки приводило к индукции гипометилирования *LINE-1* и *Alu* повторов (метод COBRA, Combined Bisulfite Restriction Analysis) в их отдаленных потомках (16–20-клеточная генерация). Что касается более низких доз облучения (X-лучи 0.5 Гр и ^{56}Fe 0.1 Гр), только воздействие рентгеновского

излучения в дозе 0.5 Гр приводило к значимому эффекту гиперметилирования. Существенное увеличение тотального уровня 5-метилцитозина (метод MSAP, methylation sensitive amplified polymorphisms) выявлено только для X-лучей в дозе 0.5 Гр, а его уменьшение — для ^{56}Fe (1 Гр). При всех вариантах эксперимента не выявлено изменений в метилировании промоторов изученных генов (*NFkB*, *TSLC1*, *CDH1*) (метод метилспецифической ПЦР, бисульфитное пиросеквенирование) [72, 73]. В целом с этими данными согласуются результаты, полученные в других исследованиях с использованием других клеточных линий. Так, показана индукция гипометилирования *LINE-1* в отдаленных потомках клеток колоректальной карциномы человека RKO, подвергшихся воздействию X-лучей в дозе 1 Гр. Однако такое же воздействие приводило к гиперметилированию этих элементов генома в первичных диплоидных фибробластах кожи человека AGO1522D. Рассматриваемых эпигенетических изменений *Alu* повторов не выявлено. Однако воздействие протонов и ионов ^{56}Fe приводило к гипометилированию *LINE-1* и *Alu* в обеих клеточных линиях. Для последних показано тотальное гиперметилирование при действии протонов и ионов, и гипометилирование при действии X-лучей [74]. Таким образом, показана зависимость рассматриваемых эпигенетических эффектов от типа радиации, ЛПЭ излучения, типа клеток, тканей, времени, прошедшем после облучения.

Показаны дисрегуляции в метилировании ДНК в потомках 20-й клеточной генерации HPV-G кератиноцитов человека, подвергшихся воздействию γ -излучения в дозах 0.1–1.0 Гр. Аналогичные нарушения выявлены в потомках клеток, обработанных средой от облученных клеток (5 Гр) и проявляющих “эффект свидетеля”. В основном преобладало гиперметилирование, в том числе в последовательностях ретротранспозона и сателлитной ДНК (*MLT1A* и *SAT2*). Эти эпигенетические нарушения сопровождались проявлениями нестабильности генома: повышенные частоты аберрации хромосом, апоптотическая и репродуктивная гибель клеток [75].

Как известно, метилирование ДНК является необходимым условием нормального роста и функционирования соматических клеток, а эмбриональные стволовые (ЭС) клетки являются удобной моделью для изучения роли этого эпигенетического процесса в механизмах таких эффектов радиации как геномная нестабильность и эффект свидетеля. DNMT1(–/–) или DNMT3A(–/–)DNMT3B(–/–) ЭС клетки, накаутированные по генам метилтрансфераз, не изменяли способность пролиферировать, сохранять постоянный набор хромосом, перицентромерные гетерохроматиновые до-

мены (метилирование лизина 9 гистона H3) и свойства недифференцированных клеток [76].

Проведена серия экспериментов, доказывающая роль метилирования ДНК и метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A (но не DNMT3B) в сохранении “памяти” в потомках облученных ЭС клеток о перенесенном воздействии γ -излучения (^{60}Co , 3 Гр, 73 сГр/мин) и в индукции нестабильности генома в клетках-соседях, культивированных в одной среде с этими клетками. Так, не выявлено отличий в частотах сестринских хроматидных обменов (СХО) в клетках, культивированных совместно с потомками облученных и необлученных “накаутированных” DNMT1–/– (или DNMT3A–/–) ЭС клеток. При этом отмечено, что в отличие от необлученных нормальных ЭС клеток (WT-клетки), клетки DNMT1–/– и DNMT3A–/– индуцировали СХО в их WT-клетках соседях, что указывает на нестабильный фенотип клеток с “накаут” генами метилтрансфераз и свидетельствует об определенном пороге, выше которого не происходит индукции нестабильности генома под действием радиации. Эксперименты с добавлением доксициклина, вызывающего временную супрессию гена *DNMT1*, подтверждают роль метилтрансфераз-опосредованных механизмов в сохранении и передаче сигнала о нестабильности генома клеткам, соседствующим в культуре с потомками облученных клеток [77].

Экспериментальные исследования ЭС клеток, характеризующихся различным уровнем метилирования ДНК (результат наличия или отсутствия ДНК-метилтрансфераз), показали, что их радиочувствительность (радиационно-индуцированная отсроченная геномная нестабильность) не определяется только сниженным уровнем метилирования генома, а зависит от присутствия в клетке в активном состоянии определенных ДНК-метилтрансфераз. Так, отсутствие DNMT1 (но не DNMT3A и DNMT3B) приводило к 10-кратному увеличению *de novo* *HPRT* мутаций, но этот уровень не изменялся при воздействии радиации; напротив, в ЭС клетках дикого типа радиационно-индуцированная нестабильность генома в отдаленных потомках облученных клеток имела место. Такая парадоксальность результатов, по видимому, объясняется тем, что требуется специфический паттерн метилирования и/или присутствия метилтрансфераз, чтобы рассматриваемый феномен имел место. Предполагается, что изменения в активности DNMTs или паттерне метилирования ДНК потенциально может изменять секреторный профиль клетки (такие факторы как TNF α , NO и TGF β), что влияет на стабильность генома [78]. Эта проблема является очень важной, так как лежит в основе механизмов радиорезистентности особой популяции опухолевых клеток, имеющих характеристики, аналогичные таковым стволовых клеток (потенциал к самообновлению, спо-

способность формировать опухоли, генетический и эпигенетический код) [79, 80].

Экспериментальные исследования in vivo

Изменения тотального уровня метилирования ДНК. Эксперименты, проведенные на клетках тимуса и ККМ аутбредных мышей Wister свидетельствуют о динамическом характере гипо-/гиперметилирования синтезируемой ДНК в течение первых 9 дней после облучения животных, и относятся к концу 70-х годов прошлого века [81]. Позже было выявлено снижение уровня 5-метилцитозина (метод HPLC) в печени мышей C57BL/6NJcI через 8 ч после воздействия (X-лучи, 4–7 Гр), а не сразу после экспозиции. Эффект гипометилирования сохранялся в течение всего эксперимента (8–72 ч) и не зависел от дозы. Аналогичные эффекты в клетках мозга и селезенки отсутствовали [29].

Показано, что облучение мышей СВА/Н (X-лучи, 3 Гр) приводило к снижению тотального уровня 5-метилцитозина (на 8%, HPLC-метод) в клетках ККМ животных, но не селезенки, через 4–14 дней после воздействия. Причем рассматриваемый эффект не наблюдался у мышей линии C57BL/6, являющихся резистентными к радиационно-индуцированной индукции острой миелоидной лейкемии (ОМЛ) и хромосомной нестабильности. При этом степень гибели клеток в гипометилированном костном мозге (больше 80%) превышает таковую в селезенке (50%) и не различается у животных с рассматриваемыми генотипами. Полученные данные свидетельствуют о связи гипометилирования с повышенной радиочувствительностью генома клеток. Учитывая то, что у животных обеих линий общая радиочувствительность и кинетика восстановления ККМ одинаковы, различия в индукции эпигенетических модификаций в зависимости от генотипа особи не могут объясняться исключительно особенностями пролиферативной активности клеток [82].

У потомков облученных мышей-самцов C57BL/6 и обоих облученных родителей (острое воздействие, X-лучи, 2.5 Гр), наряду с повышенной частотой разрывов ДНК в тимусе, наблюдались существенные отклонения в эпигенетической регуляции: снижение глобального метилирования, сопровождающееся пониженной экспрессией ДНК-метилтрансфераз DNMT1 (восстановление метилирования в дочерней нити ДНК после репликации), DNMT3A и DNMT3B (метилирование *de novo*), а также метил-СрG-связывающего белка MeCP2 – фактора, регулирующего экспрессию генов и ремоделирование хроматина [83]. Аналогичные изменения выявлены в тимусе мышей, подвергшихся фракционированному воздействию X-лучей в дозе 0.5 Гр [84].

В клетках молочной железы крыс после острого воздействия X-лучей в дозе 5 Гр также наблюдались существенные изменения эпигенетического статуса (глобальное гипометилирование, сопровождающееся снижением экспрессии ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A, DNMT3B и белка MeCP2) наряду с повышением уровня белков внутриклеточных сигнальных систем (фосфорилированные киназы p-ERK1/2 и p-AKT), белков репарации (RAD51, KU70, POLB-фермент) и контроля клеточного цикла (циклины D1, D3 и PCNA). Через 6 ч после облучения отмечался повышенный уровень апоптоза, что сопровождалось незначительным повышением клеточной пролиферации [85]. Авторы рассматривают полученные данные в контексте связи этих изменений с механизмами канцерогенеза. Следует отметить, что аналогичные эпигенетические нарушения выявлены и в раковых клетках молочной железы человека [86].

Острое и фракционированное воздействие радиации (50 сГр за 10 дней, т.е. 5 сГр за день, 0.2 сГр/с) на мышей линии C57/B16 приводило к значительному снижению метилирования ДНК в клетках селезенки и печени у самок. Напротив, у самцов выявлено глобальное гиперметилирование ДНК клеток селезенки и отсутствие каких-либо эпигенетических изменений в клетках печени. Выявленное глобальное гипо- и гиперметилирование было сопряжено соответственно со сниженной и повышенной экспрессией ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B. Изменение активности DNMT1 наблюдалось только у самок в клетках печени после хронического облучения. Выявлена роль половых гормонов, в частности эстрогенов, в индукции изменений в метилировании ДНК [87]. Тканеспецифичный и зависящий от пола облученной особи характер изменений метилирования ДНК отмечен и в других публикациях этих авторов [88, 89]. При этом показано, что хроническое облучение в высоких дозах (5 Гр) не приводит к изменению паттерна метилирования ДНК [89].

Выявлено существенное снижение уровня глобального метилирования (метод HPLC) в клетках крови мышей BALB/c через 2 ч после их фракционированного облучения (0.5 Гр, 10 дней, X-лучи) и отсутствие эффекта спустя 1 мес. после радиационного воздействия [90].

Показано, что через 22 нед после перенесенного мышами C57BL/6 воздействия ионов ^{56}Fe в дозе 40 сГр уровень тотального метилирования ДНК (метод ELISA) в клетках легкого существенно превышал аналогичный показатель в контроле. При этом значимый эффект отсутствовал при облучении в дозе 10 и 20 сГр [91].

В отдаленные периоды (1 нед, 1 мес.) после воздействия на мышей СВА/СaJ ионов ^{48}Ti (0.1–

0.5 Гр, 0.01 Гр/мин, 1 GeV/n) выявлено зависимое от дозы увеличение общего уровня метилированных цитозинов (ELISA метод) в клетках печени животных. Через 6 мес. после радиационного воздействия значимое повышение рассматриваемого эпигенетического показателя наблюдалось только при облучении в дозе 0.5 Гр. Напротив, уровень 5-гидроксиметилцитозина был снижен во всех вариантах эксперимента и зависел от дозы облучения. Выявленные изменения паттерна метилирования сопровождались выраженным хроническим оксидативным стрессом (повышение уровня малонового диальдегида) и воспалительным ответом (возрастание уровней активированного NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6) [92].

Выявлен разнонаправленный характер изменений общего уровня метилирования ДНК (метод ELISA) в гонадах самок и самцов крыс Sprague-dawley, получавших от рождения до 9-месячного возраста питьевую воду, содержащую природный уран UO₂ (40 мг/л): гипометилирование ДНК клеток яичников (на 18% меньше, чем в контроле) и гиперметилирование ДНК (на 17% больше) клеток семенников. Аналогичные изменения, но в большей степени, наблюдались в этих же тканях в F1 и F2 поколениях животных, что указывает на трансгенерационный характер эпигенетических нарушений. Выявлены также изменения в экспрессии ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), что не всегда коррелировало с уровнем метилирования ДНК и указывает, по мнению авторов, на посттранскрипционные эффекты регуляции активности энзимов [93].

В костномозговых гемопоэтических клетках (стволовых и клетках-предшественниках, HPCs) мышей C57BL/6J выявлен разнонаправленный характер изменений паттерна метилирования в ближайшие (4 нед) и отдаленные (22 нед) сроки после воздействия на животных ⁵⁶Fe (0.1, 0.2 и 0.4 Гр). Так, эпигенетический статус этих клеток после облучения характеризовался отчетливой тенденцией к повышенному тотальному уровню 5-метилцитозина (иммунофлуоресцентный метод). По прошествии 22 нед наблюдалось дозозависимое уменьшение тотального уровня метилирования генома, значимое при дозе 0.4 Гр [94].

Изменения метилирования повторяющихся элементов ДНК. Не выявлено изменений уровней метилирования повторов (методы высокочувствительного плавления и пиросеквенирования) *LINE-1*, *SINE B1* и *IAP* в клетках периферической крови мышей C57BL/6 спустя 85–420 дней после воздействия на них X-лучей в дозе 10 мГр по сравнению с таковыми показателями, зарегистрированными за 3 дня до облучения животных. Аналогичные результаты получены для клеток селезенки и печени спустя 420 дней после воздействия радиации, хотя, как известно, клетки этих орга-

нов обладают высокой радиочувствительностью и выраженными возрастными изменениями соответственно [95].

В то же время облучение мышей радиочувствительных (BALB/c и CBA) и радиорезистентной (C57BL/6) линий в дозе 1 Гр (X-лучи) приводило к изменениям метилирования, зависящих от генотипа организма, пола, исследованной ткани, времени после облучения и типа изученного повтора (*LINE-1*, *SINE B1* и *IAP*). Наиболее выраженный ответ наблюдался у самцов BALB/c и CBA. Показано, что животные всех линий проявляли ранний ответ на облучение (через 1 день после воздействия), характеризующийся возрастанием уровня метилирования *LINE-1* элемента. Причем у мышей BALB/c эти эпигенетические изменения сохранялись и через 6 дней после воздействия, а у радиорезистентных животных C57BL/6 наблюдалась потеря метилирования через 14 дней после экспозиции [96].

Не выявлены изменения метилирования *LINE 1* повторов (*TF* и *A1* мономеры, бисульфитное пиросеквенирование) в легких и печени мышей C3H/HeN через 1–120 сут после воздействия на них ⁵⁶Fe в дозах 10, 30 и 100 сГр по сравнению с таковыми показателями у необлученных животных [96]. В то же время в уже упомянутой работе [91] уровень метилирования *LINE1* повтора (метилчувствительная MsrBC-qPCR) в клетках легкого у мышей через 22 нед после перенесенного животными воздействия ионов ⁵⁶Fe в дозе 40 сГр существенно превышал аналогичный показатель в контроле. При этом значимый эффект отсутствовал при облучении в дозе 10 и 20 сГр. Заслуживает внимания факт, что при этом наблюдалась существенная потеря экспрессии *LINE 1* и *SINE1* транспозонов, а также других повторов (Charlie, минорные сателлиты), проявивших тенденцию к гиперметилированию.

Через 2 мес. после воздействия γ -радиации в дозах 0.1 и 1 Гр на мышей C57BL/6J и CBA/J наиболее выраженный эффект индукции гипометилирования 5'-нетранслируемых регионов (5'-UTRs) *LINE-1* элементов наблюдался в гемопоэтических стволовых клетках (HSCs) у радиочувствительных CBA/J животных, склонных к канцерогенезу системы кроветворения. Эффект был более выражен при облучении в большей дозе. В предшественниках зрелых клеток крови (HPCs) наблюдались разнонаправленные эффекты при воздействии излучения в дозе 0.1 и 1 Гр: гиперметилирование и гипометилирование соответственно. В мононуклеарных клетках (MNCs) у этих же мышей выявлено радиационно-индуцированное гиперметилирование с наиболее выраженным эффектом при воздействии в дозе 1 Гр. Таким образом, направленность и выраженность радиационно-индуцированных изменений метилирования 5'-UTRs

LINE-1 элементов зависела от генотипа особи, вида анализируемых клеток, дозы облучения [97].

Выявлена индукция гипометилирования *LINE-1* ORF1 (кодирует шаперон ORF1p) в клетках сердца мышей C57BL/6J через неделю после воздействия на животных излучений с высокой ЛПЭ: протонов (0.1 Гр, 150 MeV, 0.53 ± 0.08 Гр/мин), тяжелых ионов ^{56}Fe (0.5 Гр, 600 MeV, 0.38 ± 0.06 Гр/мин). Радиационно-индуцированные изменения метилирования других исследованных повторов (*ERV1*, *ERV2*, *SINE B1*, *SINE B1*, транспозоны *Charlie* and *Mariner*, центромер-ассоциированная сателлитная ДНК) не наблюдались. В то же время на 90-й день после облучения выявлено гиперметилирование нескольких изученных повторяющихся последовательностей ДНК, индуцированное в результате воздействия этих плотноионизирующих излучений: *LINE-1* ORF1, *ERV2*, а для *SINE B1* и основных сателлитов этот эффект наблюдался только при воздействии тяжелых ионов ^{56}Fe , но не протонов [98].

В костномозговых гемопоэтических клетках (стволовых и клетках-предшественниках, HPSCs) мышей C57BL/6J выявлен разнонаправленный характер изменений паттерна метилирования *LINE1* и *SINE B1* повторов (метилчувствительная Real-time PCR) в ближайшие (4 нед) и отдаленные (22 нед) сроки после воздействия на животных ^{56}Fe (0.1, 0.2 и 0.4 Гр): статистически значимая зависимость от дозы индукция гиперметилирования и тенденция к их гипометилированию соответственно. В то же время в более дифференцированных мононуклеарных клетках (MNCs) через 4 нед после облучения наблюдалось зависящее от дозы гипометилирование *LINE1* и *SINE B1* (при облучении в дозе 0.4 Гр изменения были статистически значимые) [94]. Полученные результаты демонстрируют разный ответ клеток гемопоэтической системы на облучение, что связано со степенью их дифференцировки, сопряженной с разным эпигенетическим статусом. Показано, что менее дифференцированные HPSCs клетки имеют более высокие уровни тотального метилирования генома (на 19% выше), метилирования *LINE1* и *SINE B1* повторов (в 5–10 раз выше) и экспрессии ДНК-метилтрансфераз (в 2.0–4.6 раза выше) по сравнению с дифференцированными MNCs клетками. Эти результаты согласуются с выводами, сделанными другими исследователями [99], в том числе о том, что ответ клеток организма на метил-дефицитную диету будет определяться паттерном метилирования [100].

Выявлена (бисульфитное пиросеквенирование) существенная индукция гипометилирования *LINE-1* ORF1 в ткани легкого после воздействия протонов и последовательного действия протонов (1-й день) + ^{56}Fe (2-й день). В этой же работе показано, что воздействие протонов

(0.1 Гр, 150 MeV/n), ^{56}Fe (0.5 Гр, 600 MeV/n) или протонов (1-й день) + ^{56}Fe (2-й день) приводило преимущественно к гиперметилированию 5'-UTRs области *LINE-1*, имеющих больший эволюционный возраст, а паттерн метилирования “более молодых” повторов оставался неизменным спустя 4 нед после облучения [101]. Следует отметить, что показана обратная связь между уровнем метилирования и эволюционным возрастом *LINE-1*. При этом в эксперименте *in vitro* с RAW264 мышиными макрофагами воздействие деметилирующего агента 5-aza-dC приводило к значимому снижению метилирования “более молодых” повторов, способных к реактивации и ретранспозиции. Кроме того, эксперименты *in vivo* с мышами, находящимися на метионин-дефицитной диете, свидетельствуют о существенной потере метилирования в пределах 5'-UTRs области только двух А-типов *LINE-1*: *LIMda_I* (0.21 Myr) и *LIMda_VI* (4.7 Myr) [101].

Локус-специфические изменения метилирования ДНК. Показана реальность индукции гиперметилирования генов при воздействии на животных как ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ (^{56}Fe , 10–100 сГр), так и низкой ЛПЭ (Х-лучи, 50 сГр). Так, показано радиационно-индуцированное гиперметилирование 811 регионов генома (иммунопреципитация+ДНК-микрочип: MeDIP-on-chip), определяющих все основные биологические процессы, в клетках крови мышей BALB/c через 2 ч после перенесенного хронического радиационного воздействия (0.5 Гр, 10 дней, Х-лучи). Для двух генов репарации и клеточного цикла (*Rad23b* и *Ddit3*) проведено изучение (бисульфитное секвенирование) и выявлено сохранение aberrантного эпигенетического маркирования через 1 мес. после облучения, что сопряжено со сниженной экспрессией этих генов [90].

Выявлены изменения метилирования промоторов генов (бисульфитное пиросеквенирование) в легких, но не в печени, у мышей C3H/HeN, подвергшихся воздействию ^{56}Fe в дозах 10, 30 и 100 сГр. Показана зависимость наблюдаемых эффектов от дозы облучения, причем в целом воздействие в более низких дозах ассоциировалось с наибольшими эффектами. Так, в ближайшие сроки после облучения (1-й день) выраженное гиперметилирование наблюдалось для всех изученных генов (*DAPK1*, *EVL*, *14.3.3*, *p16*, *MGMT*, *IGFBP3*) только при воздействии в дозе 10 сГр. Выраженность и направленность отдаленных эпигенетических эффектов определялись временем, прошедшим после облучения, дозой радиации, анализируемым локусом и имели циклический характер. Так, на 7-й день после радиационного воздействия наблюдалось существенное гипометилирование *DAPK1* и *14.3.3* при облучении только в дозе 10 сГр, а для других генов ана-

логичный эффект наблюдался при всех дозах. Через 30 и 120 дней после облучения для пяти изученных генов (*DAPK1*, *EVL*, *14.3.3*, *p16*, *MGMT*) отмечалась разнонаправленность в изменении метилирования при облучении в дозах 10 и 30 сГр: гиперметилирование через 30 дней после воздействия и гипометилирование через 4 мес. после облучения. Эти эффекты не наблюдались при воздействии в дозе 100 сГр [96].

Результаты изучения локус-специфических изменений метилирования (Mouse Lung Cancer DNA Methylation PCR Array) в клетках легкого мышей через 22 нед после перенесенного животного воздействия ионов ^{56}Fe в дозе 10–40 сГр свидетельствуют о наличии значимых эффектов облучения преимущественно при самой низкой дозе – 10 сГр: пять (*Cadm1*, *Cdh13*, *Cdkn1c*, *Mthfr* and *Sfrp1*) из 22 исследованных генов, потенциально ассоциированных с развитием рака легкого, были гиперметилированы, при том, что воздействие в более высоких дозах приводило к абберрантному метилированию только одного гена – *Cdkn1c* [91].

Выявлены устойчивые изменения уровней (иммунопреципитация + секвенирование: MeDIP-Seq) метилирования и гидроксиметилирования CpG-сайтов в клетках левого желудочка сердца, а также гиппокампа через 5 мес. после воздействия на мышей протонов (1 Гр, 150 MeV). Выявленный спектр CpG-динуклеотидов, характеризующихся эпигенетическим ремоделированием, индуцированным в результате облучения, имел тканеспецифичный характер и затрагивал гены, ответственные за развитие и дифференцировку клеток сердца и сосудов (*SRF*, *Nkx2-5*, *Miocardin* и др.), а также рост аксонов, дифференцировку нейронов, нейрогенез, синаптическую передачу, G-протеиновый сигналинг [102]. В другом исследовании этих же авторов выявлены изменения уровней метилирования и гидроксиметилирования CpG-сайтов генома в клетках гиппокампа мышей, подвергшихся воздействию ^{56}Fe (600 MeV) в дозах 0.1 и 0.4 Гр (но не 0.2 Гр), регистрируемые через 2 нед после облучения, что коррелировало с когнитивными изменениями. При этом сохранность эпигенетического ремоделирования генома по прошествии 20 нед после воздействия отмечалась только в отношении уровней 5-гидроксиметилцитозина и коррелировала с экспрессией генов [103, 104].

Показано выраженное аномальное метилирование промотора гена опухолевого супрессора *p16/INKa* при хроническом низкодозовом воздействии (50 сГр за 10 дней, 0.2 сГр/с, X-лучи). Отмечены тканеспецифичные и зависящие от пола различия в метилировании. У самцов облученных мышей метилирование промотора гена *p16/INKa* в клетках печени было более выражено,

чем у самок. Напротив, для клеток мышечной ткани не выявлено различий по этому показателю у особей разного пола. Не выявлено существенных изменений после радиационного воздействия в метилировании промотора гена *MGMT*. Авторы также заключают, что хроническое воздействие радиации в малых дозах является более сильным индуктором эпигенетических эффектов, а значит и дестабилизации генома, чем острое облучение в той же дозе [88].

У мышей BALB/c уровень метилирования восьми из 23 проанализированных сайтов CpG-островка гена *p16* (бисульфитное секвенирование) был существенно выше в радиационно-индуцированных тимических лимфомах, индуцированных облучением в дозе 1.75 Гр (4-MV линейный ускоритель), чем в необлученных образцах тимуса, что сопровождалось транскрипционной инактивацией этого гена [105].

Показано, что внутриутробное облучение (MicroCT scanner) мышей-самцов A^y/y агути (но не самок) приводило к гиперметилированию *IAP* промотора (часть инсерции *IAP* элемента в псевдоэкзоне PS1A, расположенном перед промотором дикого типа) в клетках хвоста и печени при воздействии в дозах 0.7–3 сГр, но не 0.4 и 7.6 сГр, что коррелировало с окраской шерсти – псевдоагути, характерной для животных, имеющих пониженный риск развития ожирения, рака, инсулиновой резистентности. Таким образом, в данном случае радиационное воздействие приводило к положительному адаптивному эффекту, индукция которого зависела от дозы и пола особи [106].

Гиперметилирование промоторов генов *p16/INK4A* и *RASSF1*, повышенная активность ДНК-метилтрансфераз и модификации гистонов наблюдались также в клетках кожи мышей, подвергшихся воздействию УФ-В, а также в опухолях кожи, индуцированных этим излучением [107].

Выявлены нарушения импринтинга гена *H19* в сперме мышей, подвергшихся хроническому воздействию рентгеновского излучения (1.3 Гр) на постмейотической стадии сперматогенеза, и аналогичные изменения паттерна метилирования контрольного региона импринтинга в печени потомков [108].

В целом отмечены тканеспецифичные, зависящие от пола, анализируемого локуса, дозы и мощности дозы, типа воздействующей радиации, времени, прошедшем после облучения, различия в выраженности индуцированного абберрантного эпигенетического маркирования.

Радиационно-индуцированные изменения метилирования ДНК как проявления “эффекта свидетеля”. Имеются данные, свидетельствующие о сопряженности эпигенетических нарушений с индукцией “эффекта свидетеля” на уровне организма *in vivo*. Так, показано, что после локального воз-

действия рентгеновского излучения на область черепа крыс в дозе 20 Гр (терапевтическая доза при лечении опухолей головного мозга) индуцируется “эффект свидетеля” в необлученной селезенке (свинцовая защита) этих же животных, сопряженный с существенной дисрегуляцией эпигенетических механизмов, о чем свидетельствуют изменения ряда показателей, выявляемые даже через 7 мес. после облучения: глобальное ДНК гипометилирование, изменения в метилировании *LINE-1* повторов и области ретротранспозонов, снижение экспрессии ДНК-метилтрансфераз и метил-СрG-связывающего протеина MeCP2. Кроме того, выявлены значительные изменения в экспрессии *miR-194*, мишенью которых являются как ДНК-метилтрансфераза DNMT3A, так и MeCP2. Этими же авторами показана значимость пола особи в индукции “байстендер эффектов” (повреждения ДНК, изменения клеточной пролиферации и апоптоза, глобального метилирования ДНК) в необлученной селезенке у мышей, подвергшихся радиационному воздействию на область головы [109, 110].

Проведено моделирование “эффекта свидетеля” на лабораторных животных (мыши C57BL/6), которые подверглись острому (0, 5 Гр) или фракционированному (0, 1 Гр/день, 5 дней) воздействию рентгеновских лучей, при этом рассматривались два варианта эксперимента: облучение всего тела и локальное облучение черепа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что как фракционированное, так и острое облучение вызывают “эффект свидетеля” в необлученных селезенке и коже, однако его эпигенетические проявления (гипометилирование ДНК, снижение экспрессии метил-СрG-связывающего протеина MeCP2, изменение спектра микроРНК) в коже и селезенке были различными. Так, только в селезенке они наблюдались даже через 14 дней после облучения [111].

Показано, что хотя через 4 дня после облучения у мышей только одной половины тела (X-лучи, 1 Гр, 2 сГр/с) в клетках облученной и необлученной кожи (свинцовая защита) уровень разрывов ДНК достиг контрольного уровня, в “байстендер” клетках сохраняются изменения, характеризующиеся дисрегуляторными процессами в метилировании ДНК, а именно сверхэкспрессирована ДНК-метилтрансфераза DNMT1, а уровни метил-СрG-связывающих протеинов MeCP2 и MBD2 значительно повышены, что не отмечено для облученных клеток [112].

В целом эпигенетические изменения, характерные для “эффекта свидетеля”, зависят от анализируемого органа, мощности дозы, области тела, подвергшейся облучению. Эта проблема является крайне важной и должна учитываться при разработке стратегии и тактики радиотерапии

злокачественных опухолей и последующих лечебно-диагностических мероприятий с целью минимизации риска развития побочных эффектов в здоровых тканях организма.

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У ЧЕЛОВЕКА

Изменения тотального уровня метилирования ДНК. Имеется лишь одна работа, результаты которой свидетельствуют о тотальном гипометилировании генома у рабочих атомной индустрии (анализ с применением антител к 5-метилцитозину), подвергшихся комбинированному воздействию излучений с высокой и низкой ЛПЭ. При этом выявлена обратная корреляционная связь между уровнем метилированных цитозинов и частотой aberrаций хромосомного типа в группе облученных лиц, а также дозой облучения, накопленной ими за последние 1.5 года, предшествовавших взятию образцов крови. Кроме того, отмечено, что у рабочих с суммарной накопленной дозой больше 103.14 мЗв уровень метилирования генома был существенно выше такового при более низких уровнях облучения (менее 103.14 мЗв), что указывает на дифференциальный характер ответа эпигенома на воздействие в низких и высоких дозах. По мнению авторов, возрастание рассматриваемого эпигенетического показателя при увеличении дозы облучения имеет защитный механизм [113]. В последующей работе этого же коллектива авторов также показано снижение общего уровня 5-метилцитозина (люминометрический анализ метилирования, LUMA) в лейкоцитах крови работников (промышленная радиография), подвергшихся воздействию γ - и рентгеновского излучений [114].

Изменения метилирования повторяющихся элементов ДНК. В уже упомянутой работе [113] показано, что средний уровень метилирования *LINE-1* элемента выше в группе облученных работников, чем у необлученных индивидов, но уменьшался с ростом тотальной дозы облучения. Показана тенденция к прямой ассоциативной связи между уровнями метилирования *LINE 1* и частотой aberrаций хроматидного типа у рабочих атомной промышленности. По мнению авторов, гетерохроматизация хроматина приводит к замедленной кинетики репарации разрывов ДНК. Напротив, в работе [114] выявлено *LINE-1* гипометилирование (бисульфитное пиросеквенирование) у специалистов по радиографии, подвергшихся воздействию редкоизионизирующей радиации на производстве (X-лучи, γ -лучи). При этом отмечена обратная корреляция между уровнем метилирования *LINE-1* и частотой анеуплоидий по 1-й и 4-й хромосомам, а также между рассматриваемым эпигенетическим показателем и накоплен-

ной дозой облучения, рассчитанной при исключении значений дозовых нагрузок за последние 3 года, предшествующие исследованию. По мнению авторов, это свидетельствует о сопряженности снижения метилирования диспергированных повторов с отсроченной индукцией нестабильности генома [114].

Локус-специфические изменения метилирования ДНК. Имеются единичные работы, свидетельствующие о гиперметилировании промоторов генов, выявленном в нормальных и опухолевых клетках человека, подвергшегося внутреннему облучению за счет поступления в организм радионуклидов — источников α -излучения.

Так, результаты анализа ДНК, выделенной из образцов слюны работников урановых рудников, подвергшихся пролонгированному воздействию α -излучения радона, свидетельствуют о дозозависимом гиперметилировании генов *p16/INK4A* и *MGMT*. Авторы отмечают, что *MGMT* локус имеет большую склонность к рассматриваемой эпигенетической модификации в результате перенесенного пролонгированного воздействия α -излучения [115].

В другой работе показано, что частота гиперметилирования гена *p16/INK4A* в аденокарциноме легкого у облученных работников ПО “Маяк” существенно превышает таковой показатель в аналогичных опухолях необлученных лиц. Выявлена зависимость метилирования локуса *p16/INK4A* в клетках этой опухоли от суммарной накопленной дозы α -излучения ^{239}Pu . Причем не выявлено различий в гиперметилировании *MGMT* и *DAP-K* в опухолях от облученных и необлученных лиц. Гиперметилирование гена *RASSF1A* преимущественно наблюдалось в опухолях, развившихся у лиц контрольной группы [116]. Последующее исследование образцов аденокарциномы легкого облученных работников выявило также существенно повышенную частоту гиперметилирования гена *GATA5* по сравнению с таковым показателем в опухолях необлученных лиц. Причем анализ метилирования промоторов пяти генов (*p16/INK4A*, *GATA5*, *PAX5beta*, *MGMT* и *DAP-K*) показал, что гиперметилирование, по крайней мере, одного гена наблюдалось в 93 и 66% аденокарцином от облученных работников и необлученных индивидов соответственно. Частота аденокарцином, индуцированных у лиц, подвергшихся радиационному воздействию, с метилированием трех и более генов двукратно превышала этот показатель в опухолях от необлученных индивидов [117].

На двух независимых выборках облученных лиц (ликвидаторы аварии на ЧАЭС и работники ПО “Маяк”) автором настоящей обзорной статьи показана реальность гиперметилирования CpG-островков промоторов некоторых генов (в частности, *p16/INKA* и *GSTP1*), выявляемого в нор-

мальных лейкоцитах крови в отдаленный период после радиационного воздействия (метилчувствительная ПЦР) [118]. Дальнейшие обследования работников ПО “Маяк” с индивидуальными рассчитанными накопленными дозами внешнего воздействия γ -излучения или комбинированного действия внешнего γ -/внутреннего α -излучений, выполненные с расширением спектра анализируемых локусов, выявили совокупность *p16/INKA*, *p53*, *GSTP1*, *SOD3*, *ATM*, *ESR1* генов, гиперметилирование которых ассоциировано с радиационным воздействием. Показана зависимость доза-эффект для выраженности рассматриваемых эпигенетических изменений [119–121].

Анализ сопряженности изменений паттерна метилирования генов (ДНК-микрочип, Illumina 450 K) с проживанием в помещениях с повышенной удельной активностью радона (>200 Бк/м³) показал как гипометилирование, так и гиперметилирование ряда CpG-сайтов, ассоциированное с воздействием излучения, как у беременных матерей, так и у их детей, обследованных с момента рождения до 15 лет. Те или иные выявленные эпигенетические изменения в локусах, потенциально ассоциированные с аномалиями в амниотической жидкости и врожденными уродствами (*PMM2*), карциномой легких (*HCG14*), глиобластомой и болезнью Альцгеймера (*NDRG2*), нефротическим синдромом (*SGPL1*), наблюдались только в определенные периоды онтогенеза [122].

МЕХАНИЗМЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫХ НАРУШЕНИЙ МЕТИЛИРОВАНИЯ

Хотя накопилось достаточно много феноменологических данных, механизмы радиационно-индуцированных изменений метилирования остаются не выясненными. Что касается механизмов снижения тотального уровня метилирования генома, некоторые исследователи это связывают с индукцией повреждений ДНК и последующей активацией механизмов их репарации. ДНК-полимеразы, вовлеченные в репарацию и рекомбинацию, используют для репарационного синтеза цитозин, а не метилцитозин [84, 89]. Во-вторых, есть мнение, что радиационно-индуцированные повреждения ДНК интерферируют со способностью ДНК-метилтрансфераз метилировать ДНК. По-видимому, этот механизм имеет место в первое время после облучения, когда проходят репарационные процессы. Кроме того, речь должна идти об активно пролиферирующих клетках [97]. В-третьих, снижение метилирования ДНК после облучения может быть результатом уменьшения экспрессии *de novo* ДНК-метилтрансфераз — ранний ответ клетки на повреждение. Действительно, в экспериментальных работах показана сопряженность гипометилирования ДНК и супрес-

сии ДНК-метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B в клетках тимуса, селезенки, печени животных, подвергшихся радиационному воздействию [84, 87]. Авторы также не исключают возможность повышения экспрессии некоторых энзимов с ДНК-деметилюющей активностью. Кроме того, в результате облучения возможно повышение экспрессии ряда микроРНК (например, miR-29, miR-141, miR-152), мишенями которых являются мРНК метилтрансфераз [123, 124]. Не исключено индуцированное радиацией ингибирование синтеза метионина и/или его трансформации в S-аденозилметионин — донора метильных групп [97]. Возможна и радиационно-индуцированная стимуляция клеточной пролиферации при отсутствии достаточного функционирования DNMT1, обеспечивающего воспроизведение родительского характера метилирования в дочерних цепях ДНК [125].

Относительно механизмов индукции гиперметилирования под действием радиации нельзя исключать, что активные формы кислорода приводят к сверхрегуляции активности ДНК-метилтрансфераз. Кроме того, индуцированные облучением разрывы ДНК могут приводить к рекрутированию ДНК-метилтрансфераз к специфическим сайтам репарации ДНК, индуцируя метилирование CpG-динуклеотидов, находящихся вблизи повреждений ДНК [126, 127].

Так, показано, что O⁽⁶⁾meG — одно из повреждений, индуцированное воздействием на ДНК некоторых продуктов метаболизма и метилирующих мутагенов окружающей среды, приводит к изменению метилирования атома углерода (в пятом положении) в цитидиновом остатке CpG пары путем изменения стабильности DNMT3A-CD (комплекс: поврежденный ДНК-дуплекс и DNMT3A-CD-каталитического домена метилтрансферазы DNMT3A) [128]. С использованием лазерной системы микрооблучения (с целью индукции повреждений генома в определенной области ядра) и флуоресцентных антител к ДНК-метилтрансферазам DNMT1, DNMT3A, DNMT3B1 и ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA) показана роль только DNMT1 в восстановлении эпигенетической информации, сопряженного с процессом репарации ДНК [129].

Интересен факт, что ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3A, экспрессирующиеся в постмитотических нейронах, играют важную роль в функционировании центральной нервной системы, а именно в процессах запоминания и обучения. Так, мыши, накаутированные по генам этих двух ферментов, показали нарушение пластичности синаптических структур в области гиппокампа, уменьшение размера нейронов, дисрегуляцию экспрессии генов MHC класса I и локуса *Stat1*, резкое снижение метилирования ДНК, а в

конечном счете — нарушение процессов запоминания и обучения [130]. Хотя, разумеется, функционирование нервных клеток имеет свои особенности: по-видимому, существует единый механизм, посредством которого клетки сохраняют и передают информацию в условиях воздействия генотоксикантов и других стрессовых факторов. Роль ДНК-метилтрансфераз в радиочувствительности и выраженности немишеных эффектов, изученных на модели ЭС клеток, уже обсуждалась ранее [77].

Судя по всему, механизм радиационно-индуцированного изменения метилирования сложный и может вовлекать многие пути. Так, в уже упомянутой работе показано, что на 7-й день после воздействия на мышей C57BL/6J протонов или ионов железа ⁵⁶Fe в клетках сердца животных экспрессия *DNMT1* и *DNMT3A*, а также *UHRF1*, вовлеченных в репарацию ДНК, была увеличена [98]. Это может быть связано с ответом клетки на индукцию повреждений ДНК [131]. Имеются экспериментальные доказательства других исследователей, что сверхэкспрессия *UHRF1* приводит к индукции гипометилирования [132]. Напротив, в более отдаленные сроки после облучения (90-й день), экспрессия ДНК-метилтрансфераз и белка MeCP2 существенно снижена, что, по мнению авторов, может являться компенсаторным механизмом в условиях индуцированного гиперметилирования. При этом синтез доноров метильных групп (метионин, SAM) был существенно повышен на 90-й день после облучения и незначительно понижен на 7-е сутки после воздействия радиации, что может быть механизмом выявленных изменений в паттерне метилирования. Кроме того, гиперметилирование генома в отдаленный срок сопровождалось снижением экспрессии белка TET1, вовлеченного в конверсию метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин [98].

Как уже отмечалось выше, очень часто о глобальном уровне 5-метилцитозина судят по показателям метилирования диспергированных повторов. С одной стороны, метилирование повторяющихся последовательностей ДНК, в первую очередь, транспозонов и ретротранспозонов, является необходимым условием их “сайлейсинга”, т.е. предотвращает реактивацию генной экспрессии и развитие геномной нестабильности. Так, показано, что кратковременное гипометилирование (96 ч после облучения: рентгеновское излучение, 0.1–2.5 Гр) промотора *LINE-1* элемента приводило к долговременным эффектам (12–24 нед после облучения) реактивации диспергированного повтора: повышенным уровням экспрессии *LINE-1 ORF1* и трансляции 148-kDa *LINE-1* протеина в клетках молочной железы крыс. Эти эпигенетические изменения сопровождалось возрастанием количества c-MYC белка, что может являться результатом инсерций *LINE-1* копий в

онкоген [133]. Сопряженность эпигенетических изменений *LINE-1* промотора (или выявленных инсерций повтора в онкоген) с активацией онкогенов *c-MET* и *c-MYC* наблюдалась и в более ранних работах других авторов в клетках злокачественных опухолей у пациентов с хроническим миелолейкозом и раком молочной железы [134, 135]. Показано, что повышенная частота L1-ретротранспозиций в облученных клетках является эндонуклеаз-зависимой и пропорциональна количеству фосфорилированных H2AX фокусов, а значит, сопряжена с индукцией двунитевых разрывов ДНК в сайтах интеграции, что является одним из механизмов нестабильности генома при активации *LINE-1* [136]. Показано, что инсерция *L1* в интрон гена может приводить к подавлению экспрессии локусов. По сути, гипометилированный интрогенный *L1* является siРНК опосредованным цис-регуляторным элементом, который может репрессировать гены посредством образования многокомпонентного нуклеопротеидного комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), обеспечивающего сайленсинг генов по механизму РНК-интерференции, и в состав которого входит белок семейства Argonaute – Ago2. Это один из механизмов подавления экспрессии генов-онкосупрессоров в клетках раковых опухолей [137].

С другой стороны, в последние годы установлено, что многие нкРНК (например, днРНК, микроРНК) состоят из последовательностей повторяющихся элементов генома, в частности, транспозонов [138, 139]. Поэтому возможна большая роль повторов в регуляции альтернативного процессинга мРНК и генерации регуляторных РНК. Нарушения в экспрессии генов могут быть вызваны изменениями в структуре хроматина в гиперметилированных транспозонах, что обеспечивает транскрипционные преграды для близлежащих энхансеров и сайленсеров. В таком случае гиперметилирование повторов может также иметь решающее значение в развитии опухолевых и других патологий.

В то же время повышение тотального уровня метилирования генома в результате хронического воздействия радиации в малых дозах выявлено не только в исследованиях *in vivo* [140–142], но и *in vitro* [143]. Показано, что индукция гиперметилирования генома, индуцированная пролонгированным облучением в малых дозах, играет существенную роль в адаптивном ответе. Так, обработка В-лимфобластных клеток линии НМу2.CIR 5-aza-dC приводила к отмене адаптивного ответа в эксперименте с адаптирующим низкоинтенсивным пролонгированным (4 нед, воздействие 3 раза в неделю, 0.78 Гр/мин) действием γ -излучения в суммарной дозе 0.032 Гр и последующим повреждающим воздействием (2 Гр). По мнению авторов, глобальное гиперметилирование генома является защитной реакцией, направленной на со-

хранение его стабильности. Эта эпигенетическая модификация приводит к формированию конденсированного гетехроматина, более резистентного к индукции повреждений ДНК под действием радиации [143].

Показано, что радиационно-индуцированные изменения метилирования не всегда сопровождаются отрицательной ассоциативной связью с транскрипционной активностью соответствующих генов или повторов и положительной корреляцией с экспрессией ДНК-метилтрансфераз [91, 94, 96–98, 101]. Это является доказательством того, что регуляция экспрессии определяется не только метилированием ДНК, но и другими механизмами, в частности, модификацией гистонов. Например, радиационно-индуцированное повышение экспрессии *LINE-1* ORF1 и ORF2 было обусловлено не снижением их метилирования, а модификацией гистонов, а именно, потерей диметилирования гистоном H3K9 и увеличением триметилирования H3K4 в 5'-UTRs регионе *LINE-1* [101].

Возможно, что индукция двунитевых разрывов, окислительных повреждений ДНК приводит к рекрутированию ДНК-метилтрансфераз (например, с участием белков репарации неспаренных нуклеотидов MSH2-MSH6) и других модификаторов гистонов, таких как белки группы polycomb (ингибиторные комплексы 1 и 2: PRC1 и PRC2), метилтрансфераза EZH2, сиртуины (например, SIRT1 катализирует деацетилирование остатков лизина в гистонах), что должно опосредовать временную локальную репрессию хроматина, препятствующую транскрипции. Репарация повреждений ДНК – это динамический процесс, который требует как открытого, так и конденсированного хроматина, а значит сопряжен с процессами ацетилирования и деацетилирования гистонов. В свою очередь, последние могут быть высокоспецифичны в отношении расстояния от сайта повреждения: ацетилирование имеет место в непосредственной близости от разрыва, а обратный процесс – на расстоянии нескольких нуклеосом от него. Кроме того, не исключена зависимость хронологии этих процессов от времени, прошедшего после индукции повреждения ДНК: ацетилирование гистонов происходит вслед за возникновением этого повреждения, а деацетилирование – после окончания восстановления генетической структуры [144–147]. Поэтому ошибки этих процессов, отсутствие их своевременной остановки и нарушения скоординированности, что, по-видимому, имеет место при хроническом действии генотоксических факторов, приводят к эпигенетическим модификациям, которые могут сохраняться длительное время в последующих клеточных делениях (например, гиперацетилированный H4K16, H3K9me2 и me3, and H3K27me3). Показано, что такие

плотноионизирующие излучения как ионы углерода ^{14}C вызывают труднорепарируемые кластерные повреждения вдоль трека частиц, локализованные в гетерохроматиновых регионах [148].

Экспериментально показано, что независимые от репликации эндогенные двунитевые разрывы ДНК (RIND-EDSBs) сохраняются преимущественно в метилированных участках генома в неацетилованном хроматине, поскольку существует временная задержка между индукцией этих повреждений и репарацией. Быстрый ответ клетки на индукцию повреждений ДНК ($\gamma\text{-H2AX}$) в этом случае блокируется компактной структурой хроматина, которая потом позволяет восстановиться EDSBs путем негомологичной рекомбинации, осуществляемой более точным АТМ-зависимым способом. Деметилирование ДНК сопряжено с эухроматизацией хроматина, а разрывы, возникшие в таких регионах, будут восстанавливаться Ku-опосредованной NHEJ, в наибольшей степени склонной к ошибкам, что приводит к нарастанию нестабильности этих регионов генома [149, 150].

ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭПИГЕНОМА

Представленные выше данные свидетельствуют о разнообразии спектра радиационно-индуцированных нарушений метилирования ДНК. Учитывая классический постулат о преждевременном старении облученного организма, в последнем разделе обзора считаем целесообразным кратко изложить все возраст-ассоциированные изменения эпигенома, касающиеся как метилирования ДНК, так и взаимосвязанных с ним процессов модификации гистонов:

1. Снижение тотального уровня гетерохроматина, сопровождаемое снижением уровней гетерохроматинового протеина HP1 и триметилированного гистона H3K9 (H3K9me3), а также изменениями в ламине A1 [151].

2. Формирование гетерохроматиновых фокусов, ассоциированных со старением (SAHF), в прежде эухроматиновых регионах, что запускается триметилированием H3K9, связыванием протеина HP1 и включением тасгоH2A-альтернативного вариантного гистона, заменяющего канонический H2A, а также HMGА (негистоновый белок хроматина с высокой электрофретической подвижностью группы А). Этот нестохастический процесс “перераспределения” хроматина вовлекает множество гетерохроматиновых протеинов, включая гистоновые шапероны [151].

3. АТФ-зависимое ремоделирование структуры хроматина, сопряженное с изменением ДНК-гистоновых контактов и являющееся результатом действия ряда механизмов. Во-первых, это

уменьшение количества канонических коровых гистонов (потеря трансляции и нарушения в экспрессии генов как результат модификации гистонов в гистон-кодирующих генах) и их замена вариантными, например, H3.3, H3.3cs1, а также тасгоH2A, способного запускать секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP, senescence associated secretory phenotype). Во-вторых, имеет место сборка нуклеосом в состав хроматина или их удаление, а также изменение позиции этих единиц хроматина по отношению к последовательности ДНК. Хроматин-ремоделирующие комплексы работают в комбинации с другими протеинами, такими как гистон-модифицирующие энзимы (метилтрансферазы, ацетилазы, деацетилазы и др.) [151].

4. Посттрансляционные модификации определенных аминокислотных остатков гистонов на N-терминальном конце (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, рибозилирование и др.). Показано, что в целом с возрастом повышается уровень эпигенетических маркеров, сопряженных с активной транскрипцией: триметилирование H3K4 (H3K4me3) и ацетилирование H4K16 (H4K16ac). Количество модифицированных гистонов, ассоциированных с транскрипционным сайленсингом и формированием гетерохроматина (H3K9me3, H3K27me3, H4K20me2 и H3K56ac), наоборот, падает. Однако имеет место и перераспределение рассматриваемых эпигенетических модификаций в пределах генома [151].

5. Релокализация хроматин-модифицирующих факторов, что лежит в основе одной из концепций эпигенетического старения и связано с механизмами ответа клетки на повреждение ДНК. Индукция последнего приводит к перемещению рассматриваемых факторов (например, сиртуины SIRT1 и SIRT6, гистоновая деацетилаза HDAC1) от регулируемых ими канонических локусов в область этого повреждения для участия в репарации ДНК. С возрастом происходит накопление ошибок восстановления исходного расположения модификаторов хроматина, приводя к aberrантной экспрессии диспергированных повторов и ряда молчащих генов [151].

6. Изменения экспрессии нкРНК (например, H19, miR-34 и др.) [151].

7. Повышение транскрипции транспозонов (*LINE-1*, *Alu*, сателлитные повторы), что связано с возраст-ассоциированным снижением гетерохроматизации и метилирования ДНК, а также с релокализацией (к сайтам нестабильности ДНК) SIRT1 деацетилазы (репрессора транспозонов) и истощением SIRT6 в течение старения. Считается, что экспрессия рассматриваемых повторов может вносить вклад в воспалительный SASP ответ [152].

8. Изменение локализации и экспрессии множества транскрипционных факторов, таких как ключевой страж стабильности генома p53, CTCF, имеющий домен цинковых пальцев, нейрорезистентный фактор REST, ингибирующий связывание Polycomb — репрессорирующих комплексов PRC1 и PRC2 с участками вблизи промотора, HSF1 (фактор теплового шока 1), являющийся регулятором экспрессии гена *Hsp70*. Кроме того, FOXO (контроль стресс-ответа, метаболизма, нейрональных функций) связывается с активным хроматином в энхансерных регионах и может действовать как фактор, инициирующий расщепление компактного хроматина; его активность регулируется AMP-активированной протеинкиназой и IGF1 (инсулин-зависимый фактор роста) ассоциированными путями, а также окислительным стрессом. Другой фактор транскрипции NRF2 модулирует экспрессию генов защитных систем клетки, активируется активными формами кислорода, метаболическими изменениями (меняется активность mTOR и IGF1) и действует путем рекрутирования хроматин-ремоделирующих факторов, таких как нуклеосом-ремоделирующий комплекс BRG2, чтобы активировать ген стресс-ответа. Показано, что все упомянутые факторы сопряжены с продолжительностью жизни и старением индивидов [153–159].

9. Тотальное гипометилирование генома и гиперметилирование промоторов генов. Предполагается, что возраст-ассоциированные изменения в транскрипционных факторах и гистон-модифицирующих энзимах влияют на метилирование ДНК и наоборот. В течение старения метилирование генов-мишеней белков группы Polycomb (PcGTs) изменяется, что является возможным объяснением изменения с возрастом триметилирования H3K27 [11, 12, 160–162]. Повышение метилирования ДНК имеет место в регионах с H3K27me3, а понижение — ассоциировано с такими активными гистоновыми метками хроматина, как ацетилирование H3K9 (H3K9ac), H3K27 (H3K27ac) и метилирование H3K4 (H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3) [163, 164].

Представляется, что возраст-ассоциированные изменения эпигенома — это, с одной стороны, результат реализации “закодированной” программы онтогенетического развития и естественного старения, механизмы которой непонятны. Так, нельзя утверждать, что CpG-часы связаны с митотическим возрастом. Несмотря на то, что темпы нарастания изменений метилирования максимальны во время наибольшей пролиферативной активности клеток организма, и эпигенетический возраст (DNAm) коррелирует с порядковым номером клеточного деления в культуре, он “отслеживает” также календарный возраст в непролиферативных тканях. С другой стороны, DNAm не является маркером клеточного

старения, так как этот показатель существенно коррелирует с хронологическим возрастом иммортализованных клеток (например, В-клетки, трансформированные вирусом Эпштейна–Барр) и номером пассажа культуры бессмертных ЭС клеток. По мнению автора, DNAm — некая кумулятивная работа, сделанная определенным родом эпигенетической системой сохранности, направленная на стабилизацию генома/эпигенома [11]. В этом плане заслуживает также внимания следующая факт. Широкогеномное исследование метилома с последующим анализом выживаемости с использованием модели Кокса выявило 2552 CpG-сайта, сопряженных с риском смерти (1403 и 1149 сайтов показали положительную и отрицательную корреляцию соответственно). Однако из них меньше 30% CpG проявили связь метилирования с возрастом. Причем для большинства этих сайтов (более чем 90%) показан разнонаправленный характер ассоциаций метилирования с возрастом и со смертностью. Таким образом, получается, что такие возраст-ассоциированные эпигенетические модификации отражают ход “здорового” старения и носят “полезный” характер для выживаемости индивида. CpG-динуклеотиды, метилирование которых сопряжено с повышенным риском смерти, в большей степени расположены в “теле” гена и межгенных промежутках, а с пониженным риском — в генных промоторах [165]. Тем не менее в геноме присутствуют десятки CpG-сайтов (а именно, 53 из 2552 CpG), метилирование которых имеет однонаправленный характер корреляций с возрастом и смертностью. Высокая точность оценки биологического возраста индивида, на основе “CpG-часов”, и его повышение по сравнению с календарным, отмечены при различных соматических заболеваниях (злокачественные новообразования, инсульты, гипертензия и др.), что подробно обсуждалось в наших предыдущих публикациях [11–15].

С другой стороны, изменения эпигенома, ассоциированные с возрастом, — это результат накопления “стохастических” событий — эпигенетических модификаций, сопряженных с ошибками воспроизведения паттерна метилирования в митотических потомках клеток, активацией клеточных программ и индукцией повреждений ДНК в результате действия эндо-/экзогенных стрессовых факторов, в том числе генотоксикантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследованиях с использованием культур клеток и лабораторных животных выявлен широкий спектр нарушений метилирования ДНК, индуцированных ионизирующими излучениями как с высокой, так и низкой ЛПЭ (тотальное гипо-/гиперметилирование, гипо-/гиперметилиро-



Рис. 1. Радиационно-индуцированные изменения метилирования ДНК и структурно-функциональная дестабилизация генома клеток.

Fig. 1. Radiation-induced changes in DNA methylation and structural/functional destabilization of the cell genome.

вание повторяющихся элементов генома, локус-специфическое гипо-/гиперметилирование). Они наблюдаются не только сразу после облучения, но и могут сохраняться на протяжении длительного периода времени. На рис. 1 подытожены имеющиеся сведения о последствиях этих эпигенетических модификаций для функционирования клеточного генома. Результаты единичных работ указывают на то, что выраженность и направленность изменений паттерна метилирования, как повторов, так и генов, зависят от структурной области, к которой относятся изученные CpG-сайты (CpG-островок промотора или транскрибируемая часть гена, *LINE-1* ORF1 или *LINE-1* 5'-UTRs, эволюционный возраст повтора). К сожалению, в большинстве работ в этом аспекте полученные данные не анализируются. В ряде исследований выявлены зависимости доза-эффект и мощность дозы-эффект для уровня нарушений в паттерне метилирования ДНК. Показана сопряженность индуцированных изменений в метилировании ДНК с проявлениями таких немитических эффектов радиации, как геномная нестабильность и «эффект свидетеля»; это направление исследований является крайне важ-

ным в аспекте радиотерапии злокачественных новообразований. На данный момент получено достаточно много данных в области молекулярной онкологии, касающихся связи радиочувствительности опухолевых клеток с их эпигенетическим статусом. Хотя установлено, что радиорезистентный фенотип таких клеток ассоциирован с гиперметилированием промоторов множества генов, механизм этого феномена очень сложный и требуется таргетное воздействие на метилирование.

На настоящий момент имеются единичные исследования, свидетельствующие о реальности дозозависимой индукции и сохранении в течение длительного времени тех или иных эпигенетических модификаций в лейкоцитах крови облученного человека. Так как старение, последствия радиационного воздействия и возраст-ассоциированные заболевания сопровождаются общими эпигенетическими нарушениями, рассматриваемая проблема является одной из наиболее важных в области молекулярной радиобиологии и геронтологии человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично выполнена в рамках темы государственного задания Минобрнауки России “Генетические технологии в биологии, медицине, сельскохозяйственной и природохозяйственной деятельности” (№ 0112-2019-0002), подтемы “Генотоксиканты и антигенотоксиканты окружающей среды: маркеры отдаленного воздействия и генетические риски развития широко распространенных заболеваний”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Виленчик М.М.* Нестабильность ДНК и отдаленные последствия воздействия излучений. М.: Энергоатомиздат, 1987. 192 с. [*Vilenchik M.M.* DNA Instability and long-term effects of radiation exposure. Moscow: Energoatomizdat. 1987. 192 p. (in Russian)]
2. *Manolio T.A., Collins F.S., Cox N.J. et al.* Finding the missing heritability of complex diseases // *Nature*. 2009. V. 461. № 7265. P. 747–753. <https://doi.org/10.1038/nature08494>
3. *Visscher P.M., Brown M.A., McCarthy M.I., Yang J.* Five years of GWAS discovery // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. V.90. № 1. P. 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029>
4. *Morgan W.F.* Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects // *Radiat. Res.* 2003. V. 159. № 5. P. 581–596. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0581:na-deoe\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0581:na-deoe]2.0.co;2)
5. *Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Балева Л.С., Сипягина А.Е.* Проблема индуцированной геномной нестабильности как основы повышенной заболеваемости у детей, подвергающихся низкоинтенсивному воздействию радиации в малых дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2006. Т. 46. № 2. С. 167–177. [*Suskov I.I., Kuz'mina N.S., Baleva L.S., Sipyagina A.E.* Problema inducirovannoy genomnoy nestabil'nosti kak osnovy povyshennoy zaboлеваemosti u detej, podvergayushchihся nizkointensivnomu vozdeystviyu radiacii v malyh dozah // *Radiac. biologiya. Radioekologiya*. 2006. T. 46. № 2. S. 167–177. (in Russian)]
6. *Сусков И.И., Кузьмина Н.С., Сускова В.С. и др.* Индивидуальные особенности трансгенерационной геномной нестабильности у детей ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (цитогенетические и иммуногенетические показатели) // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2008. Т. 48. № 3. С. 278–286. [*Suskov I.I., Kuz'mina N.S., Suskova V.S. i dr.* Individual'nye osobennosti transgeneracionnoy genomnoy nestabil'nosti u detej likvidatorov posledstviy avarii na SNAES (citogeneticheskie i immunogeneticheskie pokazateli) // *Radiac. biologiya. Radioekologiya*. 2008. T. 48. № 3. S. 278–286. (in Russian)]
7. *Пелевина И.И., Петушкова В.В., Бирюков В.А. и др.* Роль “немишеных эффектов” в реакции клеток человека на радиационное воздействие // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2019. Т. 59. № 3. С. 261–273. [*Pelevina I.I., Petushkova V.V., Biryukov V.A. i dr.* Rol' “nemishennyh effektov” v reakcii kletok cheloveka na radiacionnoe vozdeystvie // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2019. T. 59. № 3. S. 261–273. (in Russian)] <https://doi.org/10.1134/S086980311903010X>
8. *Tharmalingam S., Sreetharan S., Kulesza A.V. et al.* Low-Dose Ionizing Radiation Exposure, Oxidative Stress and Epigenetic Programming of Health and Disease // *Radiat. Res.* 2017. V. 188. Issue 4. P. 525–538. <https://doi.org/10.1667/RR14587.1>
9. *Mothersill C., Rusin A., Fernandez-Palomo C., Seymour C.* History of bystander effects research 1905–present; what is in a name? // *Int. J. Radiat. Biol.* 2018 V. 94. № 8. P. 696–707. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1398436>
10. *Нугис В.Ю., Козлова М.Г.* Проблема связи частоты aberrаций хромосом в лимфоцитах периферической крови с риском развития заболеваний, в том числе после действия радиации // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017. Т. 57. № 1. С. 18–29. [*Nugis V.Yu., Kozlova M.G.* Problema svyazi chastoty aberracij hromosom v limfocitah perifericheskoy krovi s riskom razvitiya zaboлеваenij, v tom chisle posle deystviya radiacii // *Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017. T. 57. № 1. S. 18–29 (in Russian)] <https://doi.org/10.7868/S0869803116060072>
11. *Horvath S.* DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol.* 2013. V. 14. № 10. R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
12. *Hannum G., Guinney J., Zhao L. et al.* Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates // *Mol. Cell.* 2013. V. 49. № 2. P. 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
13. *Marioni R.E., Shah S., McRae A.F. et al.* The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936 // *Int. J. Epidemiol.* 2015. V. 44. № 4. P. 1388–1396. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu277>
14. *Soriano-Tárraga K., Giralt-Steinhauer E., Mola-Caminal M. et al.* Ischemic stroke patients are biologically older than their chronological age // *Aging*. V. 8. № 11. P. 2655–2666. <https://doi.org/10.18632/aging.101028>
15. *Zampieri M., Ciccarone F., Calabrese R. et al.* Reconfiguration of DNA methylation in aging // *Mechanisms of Ageing and Development*. 2015. V. 151. P. 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.02.002>
16. *Jones P.A., Takai D.* The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001. V. 293. № 5532. P. 1068–1070 (New York, N.Y.). <https://doi.org/10.1126/science.1063852>
17. *Suzuki M.M., Bird A.* DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics // *Nat. Rev.* 2008. V. 9. № 6. P. 465–476. <https://doi.org/10.1038/nrg3241>
18. *Jones P.A.* Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nat. Rev.* 2012. V. 13. № 7. P. 484–92. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
19. *Pfeifer G.P.* Mutagenesis at methylated CpG sequences // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. V. 301. P. 259–

281.
https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7_10
20. *Bird A.P.* DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA // *Nucleic Acids Res.* 1980. V. 8. № 7. P. 1499–504.
<https://doi.org/10.1093/nar/8.7.1499>
 21. *Robertson K.D., Wolffe A.P.* DNA methylation in health and disease // *Nat. Rev.* 2000. V. 1. № 1. P. 11–19.
<https://doi.org/10.1038/35049533>
 22. *Jaco I., Canela A., Vera E., Blasco M.A.* Centromere mitotic recombination in Mammalian cells // *J. Cell Biol.* 2008. V. 181. № 6. P. 885–892.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200803042>
 23. *Blasco M.A.* The epigenetic regulation of mammalian telomeres // *Nat. Rev.* 2007. V. 8. № 4. P. 299–309.
<https://doi.org/10.1038/nrg2047>
 24. *Tomso D.J., Bell D.A.* Sequence context at human single nucleotide polymorphisms: overrepresentation of CpG dinucleotide at polymorphic sites and suppression of variation in CpG islands // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 327. № 2. P. 303–8.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00120-7)
 25. *Kulis M., Queirós A.C., Beekman R., Martín-Subero J.I.* Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 11. P. 1161–74.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.001>
 26. *Maunakea A.K., Nagarajan R.P., Bilenky M. et al.* Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters // *Nature.* 2010. V. 466. № 7303. P. 253–7.
<https://doi.org/10.1038/nature09165>
 27. *Whitfield B.L., Billen D.* *In vivo* methylation of *Escherichia coli* DNA following ultraviolet and X-irradiation // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 63. № 3. P. 363–372.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90433-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90433-0)
 28. *Kalinich J.F., Catravas G.N., Snyder S.L.* The Effect of γ Radiation on DNA Methylation // *Radiat. Res.* 1989. V. 117. № 2. P. 185–197.
 29. *Tawa R., Kimura Y., Komura J. et al.* Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues // *J. Radiat. Res.* 1998. V. 39. № 4. P. 271–278.
<https://doi.org/10.1269/jrr.39.271>
 30. *Chaudhry M.A., Omaruddin R.A.* Differential DNA Methylation Alterations in Radiation-Sensitive and Resistant Cells // *DNA and Cell Biology.* 2012. V. 31. № 6. P. 908–916.
<https://doi.org/10.1089/dna.2011.1509>
 31. *Lin R.K., Wu C.Y., Chang J.W. et al.* Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 14. P. 5807–5817.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4161>
 32. *Peterson E.J., Bogler O., Taylor S.M.* p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 20. P. 6579–6582.
 33. *Tang X., Milyavsky M., Shats I. et al.* Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 34. P. 5759–5769.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207706>
 34. *Maierhofer A., Flunkert J., Dittrich M. et al.* Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 5. e0177442.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177442>
 35. *Kuhmann C., Weichenhan D., Rehli M. et al.* DNA methylation changes in cells regrowing after fractionated ionizing radiation // *Radiother. Oncol.* 2011. V. 101. № 1. P. 116–121.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.048>
 36. *Lahtz C., Bates S.E., Jiang Y. et al.* Gamma Irradiation Does Not Induce Detectable Changes in DNA Methylation Directly following Exposure of Human Cells // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 9. e44858.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044858>
 37. *Kennedy E.M., Powell D.R., Li Z. et al.* Galactic Cosmic Radiation Induces Persistent Epigenome Alterations Relevant to Human Lung Cancer // *Scientific Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 6709.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-24755-8>
 38. *Becker B.V., Kaatsch L., Obermair R. et al.* X-ray irradiation induces subtle changes in the genome-wide distribution of DNA hydroxymethylation with opposing trends in genic and intergenic regions // *Epigenetics.* 2019. V. 14. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1568807>
 39. *Ma S., Liu X., Jiao B. et al.* Low-dose radiation-induced responses: Focusing on epigenetic regulation // *Int. J. Radiat. Biol.* 2010. V. 86. № 7. P. 517–528.
 40. *Kejik Z., Jakubek M., Kaplánek R. et al.* Epigenetic agents in combined anticancer therapy // *Future Med. Chem.* 2018. V. 10. № 9. P. 1113–1130.
<https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0203>
 41. *Zielske S.P.* Epigenetic DNA Methylation in Radiation Biology: On the Field or on the Sidelines? // *J. Cell. Biochem.* 2014. V. 116. № 2. P. 212–217.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24959>
 42. *Antwiw D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D. et al.* Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways // *Epigenetics.* 2013. V. 8. № 8. P. 839–848.
<https://doi.org/10.4161/epi.25498>
 43. *Cacan E., Greer S.F., Garnett-Benson C.* Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases // *Int. J. Oncol.* 2015. V. 47. № 6. P. 2264–2275.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3192>
 44. *Smits K.M., Melotte V., Niessen H.E.C. et al.* Epigenetics in radiotherapy: Where are we heading? // *Radiother. Oncol.* 2014. V. 111. № 2. P. 168–177.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.05.001>
 45. *Roy K., Wang L., Makrigiorgos G.M., Price B.D.* Methylation of the ATM promoter in glioma cells alters ionizing radiation sensitivity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 344. № 3. P. 821–826.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.222>
 46. *Leung R.C., Liu S.S., Chan K.Y. et al.* Promoter methylation of death-associated protein kinase and its role in irradiation response in cervical cancer // *Oncol. Rep.* 2008. V. 19. № 5. P. 1339–1345.
<https://doi.org/10.3892/or.19.5.1339>

47. Zhou H., Miki R., Eeva M. et al. Reciprocal regulation of SOCS 1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme // Clin. Cancer Res. 2007. V.13. № 8. P. 2344–2353. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2303>
48. Chen X., Liu L., Mims J. et al. Analysis of DNA methylation and gene expression in radiation-resistant head and neck tumors // Epigenetics. 2015. V. 10. № 6. P. 545–561. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1048953>
49. Kim E-H., Park A-K., Dong S.M. et al. Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines // Oncogene. 2010. V. 29. № 33. P. 4725–4731. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.223>
50. Kim Jae-S., Kim S.Y., Lee M. et al. Radioresistance in a human laryngeal squamous cell carcinoma cell line is associated with DNA methylation changes and topoisomerase II α // Cancer Biol. Ther. 2015. V. 16. № 4. P. 558–566. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1017154>
51. Luzhna L., Kovalchuk O. Modulation of DNA methylation levels sensitizes doxorubicin-resistant breast adenocarcinoma cells to radiation-induced apoptosis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 392. № 2. P. 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.093>
52. Hoffman D.R., Cornatzer W.E., Duerre J.A. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions // Can. J. Biochem. 1979. V. 57. № 1. P. 56–65. <https://doi.org/10.1139/o79-007>
53. Stavrovskaya A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells // Biochemistry. 2000. № 65. № 1. P. 95–106. (in Russian)
54. Rivera A.L., Pelloski C.E., Gilbert M.R. et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma // Neuro Oncol. 2010. V. 12. № 2. P. 116–121. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop020>
55. Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E. et al. Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents // N. Engl. J. Med. 2000. V. 343. № 19. P. 1350–1354. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431901>
56. Niyazi M., Schnell O., Suchorska B. et al. FET-PET assessed recurrence pattern after radio- chemotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma is influenced by MGMT methylation status // Radiother. Oncol. 2012. V. 104. № 1. P. 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.04.022>
57. Miousse I.R., Koturbash I. The fine LINE: methylation drawing the cancer landscape // BioMed. Res. Int. 2015. V. 2015. Art. ID 131547, 8 p. <https://doi.org/10.1155/2015/131547>
58. Dote H., Cerna D., Burgan W.E. et al. Enhancement of In vitro and In vivo Tumor Cell Radiosensitivity by the DNA Methylation Inhibitor Zebularine // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 12. P. 4571–4579. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0050>
59. Kim H.J., Kim J.H., Chie E.K. et al. DNMT (DNA methyltransferase) inhibitors radiosensitize human cancer cells by suppressing DNA repair activity // Radiat. Oncol. 2012. V. 7. P. 39. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-39>
60. De Schutter H., Kimpe M., Isebaert S., Nuyts S. A systematic assessment of radiation dose enhancement by 5-Aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitors in head-and-neck squamous cell carcinoma // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009. V. 73. № 3. P. 904–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.032>
61. Camphausen K., Burgan W., Cerra M. et al. Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of γ H2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275 // Cancer Res. 2004. V. 64. № 1. P. 316–321. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2630>
62. Camphausen K., Cerna D., Scott T. et al. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid // Int. J. Cancer. 2005. V. 114. № 3. P. 360–366. <https://doi.org/10.1002/ijc.20774>
63. Geng L., Cuneo K.C., Fu A. et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer // Cancer Res. 2006. V. 66. № 23. P. 11298–11304. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0049>
64. Stoilov L., Darroudi F., Meschini R. et al. Inhibition of repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in human lymphocytes exposed to sodium butyrate // Int. J. Radiat. Biol. 2000. V. 76. № 11. P. 1485–1491. <https://doi.org/10.1080/09553000050176243>
65. Qiu H., Yashiro M., Shinto O. et al. DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells // Cancer Sci. 2009. V. 100. № 1. P. 181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01004.x>
66. Ahn M.Y., Jung J.H., Na Y.J., Kim H.S. A natural histone deacetylase inhibitor, Psammoplanin A, induces cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cells // Gynecol. Oncol. 2008. V. 108. № 1. P. 27–233. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.098>
67. Li Y., PeiLiang Geng P., Jiang W. et al. Enhancement of radiosensitivity by 5-Aza-CdR through activation of G2/M checkpoint response and apoptosis in osteosarcoma cells // Tumor Biol. 2014. V. 35. № 5. P. 4831–4839. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1634-5>
68. Shin D.Y., Sung Kang H., Kim G.Y. et al. Decitabine, a DNA methyltransferases inhibitor, induces cell cycle arrest at G2/M phase through p53-independent pathway in human cancer cells // Biomed. Pharmacother. 2013. V. 67. № 4. P. 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.01.004>
69. Jiang W., Li Y.Q., Liu N. et al. 5-Azacytidine enhances the radiosensitivity of CNE2 and SUNE1 cells in vitro and in vivo possibly by altering DNA methylation // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. e93273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093273>
70. Bansal N., Mims J., Kuremsky J.G. et al. Broad phenotypic changes associated with gain of radiation resis-

- tance in head and neck squamous cell cancer // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. V. 21. № 2. P. 221–236. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5690>
71. *Mims J., Bansal N., Bharadwaj M.S. et al.* Energy metabolism in a matched model of radiation resistance for head and neck squamous cell cancer // *Radiat. Res.* 2015. V. 183. № 3. P. 291–304. <https://doi.org/10.1667/RR13828.1>
 72. *Aypar U., Morgan W.F., Baulch J.E.* Radiation-induced epigenetic alterations after low and high LET irradiations // *Mutat. Res.* 2011. V. 707. № 1–2. P. 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.003>
 73. *Aypar U., Morgan W.F., Baulch J.E.* Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? // *Int. J. Radiat. Biol.* 2011. V. 87. № 2. P. 179–191. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.522686>
 74. *Goetz W., Morgan M.N., Baulch J.E.* The effect of radiation quality on genomic DNA methylation profiles in irradiated human cell lines // *Radiat. Res.* 2011. V. 175. № 5. P. 575–587. <https://doi.org/10.1667/RR2390.1>
 75. *Kaup S., Grandjean V., Mukherjee R. et al.* Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes // *Mutat. Res.* 2006. V. 597. № 1–2. P. 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.032>
 76. *Tsumura A., Hayakawa T., Kumaki Y. et al.* Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b // *Genes Cells.* 2006. V. 11. № 7. P. 805–814. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x>
 77. *Rugo R.E., Mutamba J.T., Mohan K.N. et al.* Methyltransferases mediate cell memory of a genotoxic insult // *Oncogene.* 2011. V. 30. № 6. P. 751–756. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.480>
 78. *Armstrong C.A., Jones G.D., Anderson R. et al.* DNMTs are required for delayed genome instability caused by radiation // *Epigenetics.* 2012. V. 7. № 8. P. 892–902. <https://doi.org/10.4161/epi.21094>
 79. *Calvanese V., Horrillo A., Hmadcha A. et al.* Cancer genes hypermethylated in human embryonic stem cells // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 9. e3294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003294>
 80. *Wong D.J., Liu H., Ridky T.W. et al.* Module Map of Stem Cell Genes Guides Creation of Epithelial Cancer Stem Cells // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. № 4. P. 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.009>
 81. *Rakova I.A.* [Methylation of newly synthesized DNA in rat bone marrow and thymus after irradiation] // *Radiobiologiya.* 1979. V. 19. № 3. P. 413–416. (in Russian)
 82. *Giotopoulos G., McCormick C., Cole C. et al.* DNA methylation during mouse hemopoietic differentiation and radiation-induced leukemia // *Exp. Hematol.* 2006. V. 34. № 11. P. 1462–1470. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.06.008>
 83. *Koturbash I., Baker M., Loree J. et al.* Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006. V. 66. № 2. P. 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.06.012>
 84. *Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V. et al.* Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus // *Mol. Cancer Res.* 2005. V. 3. № 10. P. 553–561. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0074>
 85. *Loree J., Koturbash I., Kutanzi K. et al.* Radiation-induced molecular changes in rat mammary tissue: possible implications for radiation-induced carcinogenesis // *Int. J. Radiat. Biol.* 2006. V. 82. № 11. P. 805–815. <https://doi.org/10.1080/09553000600960027>
 86. *Tryndyak V.P., Kovalchuk O., Pogribny I.P.* Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins // *Cancer Biol. Ther.* 2006. V. 5. № 1. P. 65–70. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.1.2288>
 87. *Raiche J., Rodriguez-Juarez R., Pogribny I., Kovalchuk O.* Sex- and tissue-specific expression of maintenance and de novo DNA methyltransferases upon low dose X-irradiation in mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 325. № 1. P. 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.002>
 88. *Kovalchuk O., Burke P., Besplug J. et al.* Methylation changes in muscle and liver tissues of male and female mice exposed to acute and chronic low-dose X-ray-irradiation // *Mutat. Res.* 2004. V. 548. № 1–2. P. 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.12.016>
 89. *Pogribny I., Raiche J., Slovack M., Kovalchuk O.* Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 320. № 4. P. 1253–1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.081>
 90. *Wang J., Zhang Y., Xu K. et al.* Genome-wide screen of DNA methylation changes induced by low dose X-ray radiation in mice // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 3. e90804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090804>
 91. *Nzabarushimana E., Miousse I.R., Shao L. et al.* Long-term epigenetic effects of exposure to low doses of 56Fe in the mouse lung // *J. Radiat. Res.* 2014. V. 55. № 4. P. 823–828. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru010>
 92. *Jangiam W., Tungjai M., Rithidech K.N.* Induction of chronic oxidative stress, chronic inflammation and aberrant patterns of DNA methylation in the liver of titanium-exposed CBA/CaJ mice // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. V. 91. № 5. P. 389–398. <https://doi.org/10.3109/09553002.2015.1001882>
 93. *Elmhiri G., Gloaguen C., Grison S. et al.* DNA methylation and potential multigenerational epigenetic effects linked to uranium chronic low-dose exposure in gonads of males and females rats // *Toxicol. Lett.* 2018. V. 282. P. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.004>
 94. *Miousse I.R., Shao L., Chang J. et al.* Exposure to low-dose 56Fe-ion radiation induces long-term epigenetic alterations in mouse bone marrow hematopoietic progenitor and stem cells // *Radiat. Res.* 2014. V. 182. № 1.

- P. 92–101.
<https://doi.org/10.1667/RR13580.1>
95. Newman M.R., Sykes P.J., Blyth B.J. et al. The Methylation of DNA Repeat Elements is Sex-Dependent and Temporally Different in Response to X Radiation in Radiosensitive and Radioresistant Mouse Strains // *Radiat. Res.* 2014. V. 181. № 1. P. 65–75.
<https://doi.org/10.1667/RR13460.1>
 96. Lima F., Ding D., Goetz W. et al. High LET ⁵⁶Fe Ion Irradiation Induces Tissue-Specific Changes in DNA Methylation in the Mouse // *Environ. Mol. Mutagen.* 2014. V. 55. № 3. P. 266–277.
<https://doi.org/10.1002/em.21832>
 97. Miousse I.R., Chang J., Shao L. et al. Inter-Strain Differences in LINE-1 DNA Methylation in the Mouse Hematopoietic System in Response to Exposure to Ionizing Radiation // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 7. E. 1430.
<https://doi.org/10.3390/ijms18071430>
 98. Koturbash I., Miousse I.R., Sridharan V. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation of repetitive elements in the mouse heart // *Mutat. Res.* 2016. V. 787. P. 43–53.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.02.009>
 99. Hogart A., Lichtenberg J., Ajay S.S. et al. Genome-wide DNA methylation profiles in hematopoietic stem and progenitor cells reveal overrepresentation of ETS transcription factor binding sites // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 8. P. 1407–1418.
<https://doi.org/10.1101/gr.132878.111>
 100. Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Bagnyukova T.V. et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet // *J. Hepatol.* 2009. V. 51. № 1. P. 176–186.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.021>
 101. Prior S., Miousse I.R., Nzabarushimana E. et al. Densely ionizing radiation affects DNA methylation of selective LINE-1 elements // *Environ. Res.* 2016. V. 150. P. 470–481.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.043>
 102. Impey S., Pelz C., Tafessu A. et al. Proton irradiation induces persistent and tissue-specific DNA methylation changes in the left ventricle and hippocampus // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. P. 273.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2581-x>
 103. Impey S., Jopson T., Pelz C. et al. Short- and long-term effects of ⁵⁶Fe irradiation on cognition and hippocampal DNA methylation and gene expression // *BMC Genomics.* 2016. V. 17. № 1. P. 825.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3110-7>
 104. Impey S., Jopson T., Pelz C. et al. Bi-directional and shared epigenomic signatures following proton and ⁵⁶Fe irradiation // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 102–127.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09191-4>
 105. Song W.G., Liu Y.Z., Liu Y. et al. Increased P16 DNA methylation in mouse thymic lymphoma induced by irradiation // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. e93850.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093850>
 106. Bernal A.J., Dolinoy D.C., Huang D. et al. Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 2. P. 665–671.
<https://doi.org/10.1096/fj.12-220350>
 107. Nandakumar V., Vaid M., Tollefsbol T.O., Katiyar S.K. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice // *Carcinogenesis.* 2011. V. 32. № 4. P. 597–604.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq282>
 108. Zhu B., Huang X., Chen J. et al. Methylation changes of H19 gene in sperms of X-irradiated mouse and maintenance in offspring // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 340. № 1. P. 83–88.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.154>
 109. Koturbash I., Boyko A., Rodriguez-Juarez R., Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo // *Carcinogenesis.* 2007. V. 28. № 8. P. 1831–1838.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgm053>
 110. Koturbash I., Kutanzki K., Hendrickson K. et al. Radiation-induced bystander effects in vivo are sex specific // *Mutat. Res.* 2008. V. 642. № 1–2. P. 28–36.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.04.002>
 111. Ilnytskyi Y., Koturbash I., Kovalchuk O. Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue-specific manner // *Environ. Mol. Mutagen.* 2009. V. 50. № 2. P. 105–113.
<https://doi.org/10.1002/em.20440>
 112. Koturbash I., Rugo R.E., Hendricks C.A. et al. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo // *Oncogene.* 2006. V. 25. № 31. P. 4267–4275.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209467>
 113. Lee Y., Kim Y.J., Choi Y.J. et al. Radiation-induced changes in DNA methylation and their relationship to chromosome aberrations in nuclear power plant workers // *Int. J. Radiat. Biol.* 2015. V. 91. № 2. P. 142–149.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2015.969847>
 114. Cho Y.H., Jang Y., Woo H.D. et al. LINE-1 Hypomethylation is Associated With Radiation-Induced Genomic Instability in Industrial Radiographers // *Environ. Mol. Mutagen.* 2018. V. 60. № 2. P. 174–184.
<https://doi.org/10.1002/em.22237>
 115. Su S.B., Jin Y.L., Zhang W. et al. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a) and O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase genes in workers at a Chinese uranium mine // *J. Occup. Health.* 2006. V. 48. № 4. P. 261–266.
<https://doi.org/10.1539/joh.48.261>
 116. Belinsky S.A., Klinge D.M., Liechty K.C. et al. Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma // *Carcinogenesis.* 2004. V. 25. № 6. P. 1063–1067.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgh096>
 117. Lyon C.M., Klinge D.M., Liechty K.C. et al. Radiation-induced lung adenocarcinoma is associated with increased frequency of genes inactivated by promoter hypermethylation // *Radiat. Res.* 2007. V. 168. № 4. P. 409–414.
<https://doi.org/10.1667/RR0825.1>
 118. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.B. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure //

- Environ. Res. 2016. V. 146. P. 10–17.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.008>
119. Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 4. С. 341–356. [Kuz'mina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. i dr. Gipermetilirovanie promotorov genov v lejkocitah krovi cheloveka v otdalennyj period posle perenesennogo radiacionnogo vozdeystviya // Radiacionnaya biologiya. Radioekologiya. 2017. T. 57. № 4. S. 341–356. (in Russian)]
<https://doi.org/10.7868/S0869803117040014>
 120. Кузьмина Н.С., Лантева Н.Ш., Русинова Г.Г. и др. Дозовая зависимость гиперметилирования промоторов генов в лейкоцитах крови лиц, подвергшихся сочетанному воздействию гамма- и альфа-излучений // Генетика. 2018. Т. 54. Приложение. С. S22–S26. [Dozovaya zavisimost' gipermetilirovaniya promotorov genov v lejkocitah krovi lic, podvergshisya sochetannomu vozdeystviyu gamma- i al'fa-izluchenij // Genetika. 2018. T. 54. Prilozhenie. S. S22–S26. (in Russian)]
<https://doi.org/10.1134/S0016675818130118>
 121. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rusinova G.G. et al. Dose dependence of hypermethylation of gene promoters in blood leukocytes in humans occupationally exposed to external gamma radiation // Biol. Bull. 2019. № 11. P. 1563–1569 (in Russian)
<https://doi.org/10.1134/S1062359019110062>
 122. de Vocht F., Suderman M., Ruano-Ravina A. et al. Residential exposure to radon and DNA methylation across the lifecourse: an exploratory study in the ALSPAC birth cohort // Wellcome Open Res. 2019. V. 4. P. 3.
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14991.2>
 123. Koturbash I., Zemp F., Kolb B., Kovalchuk O. Sex-specific radiation-induced microRNAome responses in the hippocampus, cerebellum and frontal cortex in a mouse model // Mutat. Res. 2011. V. 722. № 2. P. 114–118.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.05.007>
 124. Wang Y., Scheiber M.N., Neumann C. et al. MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2011. V. 81. № 3. P. 839–848.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.09.048>
 125. Koturbash I., Loree J., Kutanzi K. et al. O. In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased p53 levels in shielded spleen // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2008. V.70. № 2. P. 554–562.
<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.09.039>
 126. Cuzzo C., Porcellini A., Angrisano T. et al. DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation // PLoS Genet. 2007. V. 3. № 7. e110.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030110>
 127. Morano A., Angrisano T., Russo G. et al. Targeted DNA methylation by homology-directed repair in mammalian cells. Transcription reshapes methylation on the repaired gene // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 2. P. 804–821.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt920>
 128. Maltseva D.V., Gromova E.S. Interaction of murine dnmt3a with DNA containing o6-methylguanine // Biochemistry. 2010. V. 75. № 2. P. 173–81 (in Russian)
<https://doi.org/10.1134/s0006297910020070>
 129. Mortusewicz O., Schermelleh L., Walter J., Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 25. P. 8905–8909.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0501034102>
 130. Feng J., Zhou Y., Campbell S.L. et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons // Nat. Neurosci. 2010. V. 13. № 4. P. 423–430.
<https://doi.org/10.1038/nn.2514>
 131. Mistry H., Tamblyn L., Butt H. et al. UHRF1 is a genome caretaker that facilitates the DNA damage response to gamma-irradiation // Genome Integr. 2010. V. 1. № 1. P. 7.
<https://doi.org/10.1186/2041-9414-1-7>
 132. Mudbhary R., Hoshida Y., Chernyavskaya Y. et al. UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma // Cancer Cell. 2014. V. 25. № 2. P. 196–209.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.003>
 133. Luzhna L., Ilnytskyy Ya., Kovalchuk O. Mobilization of LINE-1 in irradiated mammary gland tissue may potentially contribute to low dose radiation-induced genomic instability // Genes Cancer. 2015. V. 6. № 1–2. P. 71–81.
<https://doi.org/10.18632/genesandcancer.50>
 134. Roman-Gomez J., Jimenez-Velasco A., Agirre X. et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia // Oncogene. 2005. V. 24. № 48. P. 7213–7223.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208866>
 135. Morse B., Rotherg P.G., South V.J. et al. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma // Nature. 1988. V. 333. № 6168. P. 87–90.
<https://doi.org/10.1038/333087a0>
 136. Farkash E.A., Kao G.D., Horman S.R., Luning Prak E.T. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay // Nucl. Acids Res. 2006. V. 34. № 4. P. 1196–1204.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkj522>
 137. Apornewan C., Phokaew C., Piriyaopongsa J. et al. Hypomethylation of Intragenic LINE-1 Represses Transcription in Cancer Cells through AGO2 // PLoS One. 2011. V. 6. № 3. e17934.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017934>
 138. Kapusta A., Kronenberg Z., Lynch V.J. et al. Transposable Elements Are Major Contributors to the Origin, Diversification, and Regulation of Vertebrate Long Noncoding RNAs // PLoS Genetics. 2013. V. 9. № 4. e1003470.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003470>

139. Gim J., Ha H., Ahn K. et al. Genome-wide identification and classification of micro RNAs derived from repetitive elements // *Genomics Inform.* 2014. V. 12. № 4. P. 261–267.
<https://doi.org/10.5808/GI.2014.12.4.261>
140. Kovalchuk O., Burke P., Arkhipov A. et al. Genome hypermethylation in *Pinus sylvestris* of Chernobyl – a mechanism for radiation adaptation? // *Mutat. Res.* 2003. V. 529. № 1–2. P. 13–20.
[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(03\)00103-9](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(03)00103-9)
141. Georgieva M., Rashydov N.M., Hajduch M. DNA damage, repair monitoring and epigenetic DNA methylation changes in seedlings of Chernobyl soybeans // *DNA repair.* 2017. V. 50. P. 14–21.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.12.002>
142. Volkova P.Yu., Geras'kin S.A., Horemans N. et al. Chronic radiation exposure as an ecological factor: Hypermethylation and genetic differentiation in irradiated Scots pine populations // *Environ. Pollut.* 2018. V. 232. P. 105–112.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.123>
143. Ye S., Yuan D., Xie Y. et al. Role of DNA methylation in long-term low-dose gamma-rays induced adaptive response in human B lymphoblast cells // *Int. J. Radiat. Biol.* 2013. V. 89. № 11. P. 898–906.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2013.806832>
144. Ding N., Bonham E.M., Hannon B.E. et al. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage // *J. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 8. № 3. P. 244–254.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv050>
145. O'Hagan H.M. Chromatin modifications during repair of environmental exposure-induced DNA damage: a potential mechanism for stable epigenetic alterations // *Environ. Mol. Mutagen.* 2014. V. 55. № 3. P. 278–291.
<https://doi.org/10.1002/em.21830>
146. O'Hagan H.M., Mohammad H.P., Baylin S.B. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 8. e1000155.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000155>
147. O'Hagan H.M., Wang W., Sen S. et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands // *Cancer Cell.* 2011. V. 20. № 5. P. 606–619.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.012>
148. Lorat Y., Timm S., Jakob B. et al. Clustered double-strand breaks in heterochromatin perturb DNA repair after high linear energy transfer irradiation // *Radiother. Oncol.* 2016. V. 121. № 1. P. 154–161.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.08.028>
149. Kongruttanachok N., Phuangphairoj C., Thongnak A. et al. Replication independent DNA double-strand break retention may prevent genomic instability // *Mol. Cancer.* 2010. V. 9. P. 70.
<https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-70>
150. Pornthanakasem W., Kongruttanachok N., Phuangphairoj C. et al. LINE-1 methylation status of endogenous DNA double-strand breaks // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № P. 3667–3675.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn261>
151. Kane A.E., Sinclair D.A. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2019. V. 54. № 1. P. 61–83.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1570075>
152. Cecco M., De Criscione S.W., Peterson A.L. et al. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues // *Aging.* 2013. V. 5. № 12. P. 867–883.
<https://doi.org/10.18632/aging.100621>
153. Booth L., Brunet A. The aging epigenome // *Mol Cell.* 2016. V. 62. № 5. P. 728–744.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.013>
154. Webb A.E., Kundaje A., Brunet A. Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution // *Aging Cell.* 2016. V. 15. № 4. P. 673–685.
<https://doi.org/10.1111/acel.12479>
155. Zhang Y., Smith C.L., Saha A. et al. DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC // *Mol. Cell.* 2006. V. 24. № 4. P. 559–568.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.025>
156. Lake R.J., Boetefuer E.L., Won K., Fan H. The CSB chromatin remodeler and CTCF architectural protein cooperate in response to oxidative stress // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 5. P. 2125–2135.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1219>
157. Lu T., Aron L., Zullo J. et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's Disease // *Nature.* 2014. V. 507. № 7493. P. 448–454.
<https://doi.org/10.1038/nature13163>
158. Anckar J., Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. V. 80. P. 1089–1115.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203>
159. Gritsenko D.A., Orlova O.A., Linkova N.S., Khavinson V.K. Transcription factor p53 and skin aging // *Adv. Gerontol.* 2017. V. 30. № 1. P. 10–16.
160. Maegawa S., Hinkal G., Kim H.S. et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 3. P. 332–340.
<https://doi.org/10.1101/gr.096826.109>
161. Teschendorff A.E., Menon U., Gentry-Maharaj A. et al. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 4. P. 440–446.
<https://doi.org/10.1101/gr.103606.109>
162. Bocker M.T., Hellwig I., Breiling A. et al. Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging // *Blood.* 2011. V. 117. № 19. P. 182–190.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331926>
163. Raddatz G., Hagemann S., Aran D. et al. Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the

- human epidermis // Epigenet. Chromatin. 2013. V. 6. № 1. P. 36.
<https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-36>
164. Mcclay J.L., Aberg K.A., Clark S.L. et al. A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects // Hum. Mol. Genet. 2014. V. 23. № 5. P. 1175–1185.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt511>
165. Lund J.B., Li S., Baumbach J. et al. DNA methylome profiling of all-cause mortality in comparison with age-associated methylation patterns // Clin. Epigenet. 2019. V. 11. P. 23.
<https://doi.org/10.1186/s13148-019-0622-4>

Radiation-induced DNA Methylation Changes: *in vitro* and *in vivo* Studies

N. S. Kuzmina[#]

N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

[#]*E-mail: nin-kuzmin@yandex.ru*

The phenomenological aspects and mechanisms of DNA methylation disorders (changes in the total level of DNA methylation and in repetitive elements methylation, locus-specific methylation disorders, loss of imprinting) induced by radiation in experimental studies *in vitro* and *in vivo*, as well as in the human body are considered. The results of evaluation of relationship between the radiosensitivity of tumor cells and their epigenetic status are demonstrated. Although it has been established that the radioresistant phenotype of such cells is associated with hypermethylation of promoters of multiple genes, the mechanism of this phenomenon is very complex and a targeted impact on methylation to increase the level of damages in tumor cells leading to their death is required. The association of induced changes in DNA methylation with manifestations of such untargeted radiation effects as genomic instability and the “bystander” effect was revealed. The potential significance of the study of changes in DNA methylation in irradiated subjects in order to identify individuals with premature aging and an increased risk of age-associated pathology is discussed.

Keywords: radiation, *in vitro* and *in vivo* studies, DNA hyper-/hypomethylation, CpG-island, premature aging