

ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В БИОПТАТАХ ТКАНЕЙ И КЛЕТКАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ПОСЛЕ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Л. В. Шуленина^{1,3}, В. Ф. Михайлов¹, И. М. Васильева², Д. В. Салеева¹,
М. В. Незнанова¹, Г. Д. Засухина²

¹ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна

²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН

³Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова

Поступила в редакцию 25.10.2018 г.

Аннотация. Актуальной задачей современных медико-биологических исследований является поиск показателей экспрессии генов, ассоциированных с различными патологиями, в том числе радиационного генеза. В представленной работе систематизированы результаты наших собственных молекулярно-генетических исследований по изучению связи различных РНК-соединений (мРНК белок-кодирующих генов, микроРНК и длинных некодирующих РНК) с отдаленными эффектами действия радиации после перенесенной острой лучевой болезни и местных лучевых поражений, с формированием у пациентов с раком предстательной железы радиационно-индуцированных циститов, а также с развитием рака гортани.

Оценку уровней экспрессии длинных РНК, микроРНК и мРНК генов проводили методом ПЦР в реальном времени.

Показано, что через несколько десятков лет после острой лучевой болезни в крови у пациентов наблюдается снижение содержания miR-34a и miR-21. Обнаруженная у этих пациентов потеря корреляционных связей между P53 и его мишенями - мРНК гена *MDM2* и такими микроРНК, как miR-34a, miR-145 и другими, свидетельствует, что в отдаленный период после облучения в клетках крови наблюдается дисбаланс функционирования P53-зависимой системы поддержания стабильности генома.

В группе пациентов с раком предстательной железы, у которых при проведении лучевой терапии возникают циститы, установлено, что ещё до начала курса в крови этих пациентов наблюдается значимое повышение содержания miR-21. Таким образом, показатели уровня экспрессии генов, микроРНК и длинных РНК могут быть использованы для прогноза осложнений после лечения. Некодирующие РНК и сопряженные с ними гены могут служить мишенями для таргетной терапии.

Длинные РНК регулируют экспрессию генов в зависимости от типа клеток и тканей. Нами показано изменение содержания длинных РНК (*MALAT1*, *ROR*, *NEAT1*) при раке гортани. Выявлены различия в уровне экспрессии длинной РНК *NEAT1* у пациентов с раком гортани I-II и III-IV стадий болезни. Высокий уровень содержания *NEAT1* у пациентов III-IV стадий по сравнению с I-II свидетельствует о возможности использования этого соединения при формировании панели показателей для оценки индивидуального прогноза, позволяющего предсказать характер течения болезни.

Ключевые слова: экспрессия генов, микроРНК, длинные некодирующие РНК, ионизирующая радиация, острая лучевая болезнь, рак предстательной железы, рак гортани.

Огромный объем данных о роли регуляторных РНК, контролируемых важнейшие функции клетки, породил ряд новых направлений исследований. Эти исследования связаны с решением фундаментальных задач, к которым можно от-

нести, например, регуляцию активности генов, контролируемых клеточный гомеостаз, с целью увеличения устойчивости клетки к экзогенным воздействиям. Другим направлением являются исследования специфического ответа на патологические процессы изменения уровней экспрессии регуляторных РНК и соответствующих генов

человека, что делает возможным определение предрасположенности к заболеваниям, быстрого метода диагностики течения и прогноза болезни, применение таргетной терапии, а также предсказания возможных осложнений в процессе лечения [1, 2, 3]. Профили некодирующих РНК и генов могут служить определенными показателями реакции клетки на экзогенные воздействия: радиацию, химический мутагенез, вирусы [4, 5]. Исследование радиационных воздействий очень важны по меньшей мере с двух точек зрения: во-первых, возможности оценки последствий аварийных ситуаций, сопровождающихся огромными дозовыми нагрузками на человека и окружающую среду; во-вторых, последствий лучевой терапии (ЛТ), которая является самым распространенным методом лечения практически всех онкозаболеваний. По этой причине необходима не только оценка, но и разработка подходов к снижению неблагоприятных эффектов, возникающих в клетках и организме после воздействия ионизирующей радиации.

Радиация неодинаково повреждает различные органы и ткани вследствие их разной чувствительности. Коэффициент относительной биологической эффективности (ОБЭ) ионизирующего облучения различается не только в зависимости от органа или ткани в норме и в злокачественных опухолях, но также зависит от источника излучения.

Так, ОБЭ при α -облучении достигает 20 ед., поражающей красный костный мозг, вызывающей гематологический синдром, тогда как этот показатель при облучении нейтронами составляет 3 ед., а фотоны при любом облучении - 1 ед. [6]. При этом спектр поражения различных органов и тканей различается только степенью. Крайне важными являются данные о вовлеченности в радиотверт нервной системы. Так, было показано, что при пролонгированном облучении малыми дозами радиации достаточно высок риск развития депрессий [7]. Эти сведения представляют особый интерес, т.к. депрессивные заболевания представляют собой распространенную патологию человека.

По этой причине необходим поиск возможных биомаркеров, которые показывают или даже предсказывают патологический процесс в том или ином органе или ткани при ЛТ. В первую очередь это относится к генетическим и эпигенетическим регуляторам систем поддержания стабильности генома и пролиферации [8, 9]. В данной работе представлены наши исследования ряда генов, обеспечивающих клеточный гомеостаз и сопряженных с ними микроРНК (miR) и длинных не

кодирующих белки РНК (днРНК), которые являются регуляторами их активности, и изменение эффекта которых может служить показателем радиоответа различных тканей.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Данное исследование проведено согласно этическим принципам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

К первой группе были отнесены пациенты, перенесшие острую лучевую болезнь (ОЛБ), ОЛБ+МЛП (местные лучевые поражения) и МЛП. Объектом исследования явились образцы крови от 28 пациентов: 14 пациентов имели в анамнезе диагноз ОЛБ, 8 ОЛБ+МЛП и 6 МЛП [10]. На рис. 1 показаны результаты по распределению доз среди обследованных пациентов с ОЛБ. Контрольная группа составляет 11 доноров.

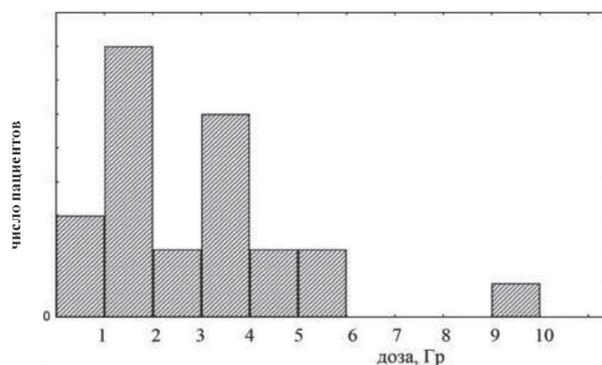


Рис. 1. Гистограмма распределения доз лучевого воздействия среди пациентов с диагнозом ОЛБ, ОЛБ+МЛП и МЛП

Вторая группа состояла из пациентов с раком предстательной железы (РПЖ). Для проведения исследований использовалась цельная кровь 32 пациентов с диагнозом рак предстательной железы (классификация T1N0M0 до T3N0M0) до и после дистанционной лучевой терапии. У 23 пациентов были выявлены циститы.

Третью группу пациентов составляли онкологические больные с плоскоклеточным раком гортани (ПРГ) в количестве 35 человек. У этих пациентов объектом исследования были биоптаты опухолей и периферическая кровь. В качестве контрольной группы использовали гистологически нормальную ткань, окружающую опухоль у этих пациентов.

Забор периферической крови у всех пациентов осуществляли в пробирки Vacuette («Greiner bio-one», Австрия), образцы опухолевой и нормальной ткани гортани обрабатывали на автоматическом гомогенизаторе Daihan HS (DAIHAN

Scientific, Ю. Корея) в растворе охлажденного тризола при скорости вращения насадки 5000 об/мин.

Тотальную РНК экстрагировали из биоптатов опухолей гортани и периферической крови с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Обратную транскрипцию мРНК и днРНК генов проводили с помощью набора «GenePak RT Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Для обратной транскрипции зрелых микроРНК из тотальной РНК использовали готовый набор «GenePak RT Core» (ООО «Лаборатория Изоген», Россия) без добавления случайных гекса- и нанонуклеотидных праймеров, но в присутствии специфического шпилькообразного («stem-loop») праймера со свободным 3'- концом к зрелой микроРНК. При каждой постановке реакции обратной транскрипции были включены отрицательные контроли, не содержащие РНК.

ПЦР в реальном времени для мРНК генов *P53*, *MDM2*, *MDM4*, длинных некодирующих РНК (*MALAT1*, *NEAT1*, *ROR*), *miR-34a*, *-125b*, *-145*, *-21*, *-181a*, *-124*, *-107*, *-16-2*, *let-7a* проводили на амплификаторе «DTprime 5M3» («НПО ДНК-Технология», Россия) в большинстве случаев с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (Thermo Scientific, США) или линейных зондов TaqMan Probe (ООО «ДНК-Синтез», Россия). Технология и праймеры для анализа представлены в опубликованных нами работах [10-13].

Уровни содержания исследуемых мРНК, микроРНК и длинных некодирующих РНК во всех образцах нормализовали по мРНК гена β -актина.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ «STATISTICA 7.0» и включала в себя определение медианы и интерквартильного размаха. Каждая ПЦР проводилась не менее 2-х раз. Для оценки достоверности различий применялся непараметрический критерий Манна-Уитни.

Корреляционные зависимости рассчитывали по непараметрическому ранговому критерию Спирмена.

Различия считали достоверными при $p < 0,05$, где p - показатель статистической значимости (достоверности) различий между изучаемыми выборками.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в клетках при повреждении ДНК ген *P53* активирует систему поддержания стабильности генома, воздействуя как транскрипционный фактор на различные гены-мишени, запуская про-

цессы остановки клеточного цикла и апоптоза. Активность системы обеспечивается комплексом взаимодействий *P53* с различными некодирующими РНК. Анализ содержания мРНК генов *P53*, *MDM2*, *MDM4*, *miR-34a*, *-145*, *-16*, *-125b*, *-21*, *let-7a* в периферической крови пациентов в отдаленные сроки после перенесения ОЛБ, ОЛБ+МЛП, МЛП, проведенный в работе, показал, что через несколько десятков лет после ОЛБ в крови у пациентов наблюдается снижение содержания *miR-34a* и *miR-21*, а у пациентов с МЛП обнаружен высокий уровень *miR-145* [10, 13]. Поскольку гены *MDM2*, *miR-34a* и *miR-145* являются мишенями транскрипционного фактора *p53*, а *miR-21*, *miR-125b*, *MDM2* и *MDM4* - антагонисты активности *P53*-зависимой системы поддержания стабильности генома, было важно исследовать наличие корреляций между экспрессией этих соединений в отдаленный период после лучевого поражения. Результаты этих исследований представлены в таблице 1.

Из таблицы 1 видно, что в периферической крови лиц, принадлежащих к группе «Доноры» (11 человек), существует достоверная положительная корреляция только между содержанием мРНК *MDM4* и мРНК *P53*, *miR-145* и мРНК *P53* ($R=0.63$; 0.74 , $p < 0.05$, соответственно). В группе «ОЛБ» обнаружена положительная корреляция между мРНК *MDM2* и мРНК *MDM4* ($R=0.59$, $p < 0,05$), в то время как между остальными показателями корреляционные взаимодействия достоверно не выявляются. В группе «ОЛБ+МЛП» корреляция исследуемых показателей статистически не значима. При анализе периферической крови лиц группы «МЛП» выявлена только одна достоверная положительная корреляция между *miR-145* и мРНК *P53* ($R=0.90$, $p < 0.05$), все остальные показатели друг с другом не коррелируют.

Следует отметить, что кроме радиационного фактора, приводящего к генетическим изменениям и оказывающего долговременное влияние на экспрессию генов, у исследуемых пациентов накапливались и возрастные изменения, приводящие к старению и вызывающие дисбаланс внутриклеточного сигнального пути. Вследствие этих причин эффективность адаптации к внешним воздействиям снижалась. Из всех изученных генов, кодирующих микроРНК, являющихся мишенями *P53*, в группе «доноры» обнаруживалась корреляционная связь лишь между *P53* и *miR-145*. Среди групп пациентов, подвергавшихся радиационному воздействию, эта связь сохранялась только в группе «МЛП».

Таблица 1

Коэффициент корреляции Спирмена R содержания мРНК генов MDM2, MDM4 и зрелых мгспроРРЦШЖ.) -34а, -145, -16-2, -125б, - 21, let-7а относительно мРНК гена P53, а также мРНК MDM2 от miR-145 и мРНК MDM4 от miR-34а в периферической крови пациентов в отдаленный период после перенесения ОЛБ, ОЛБ+МЛП, МЛП

Исследуемая группа лиц	Комбинация мРНК генов и мНКроРНК(miR)										
	P53- MDM2	P53-MDM4	MDM2- MDM4	P53-miR-125b	P53-miR-34a	P53-miR-145	P53-miR-16	P53-let-7a	P53-miR-21	MDM2-miR-145	MDM4-miR-34a
Доноры	0,02 (0,92)	0,63* (0,0004)	0,02 (0,93)	-0,27 (0,19)	0,51 (0,05)	0,74* (0,00004)	0,31 (0,11)	0,34 (0,09)	0,2 (0,36)	-0,15 (0,56)	0,35 (0,21)
ОЛБ	0,04 (0,88)	-0,06 (0,83)	0,59* (0,04)	-0,36 (0,33)	-0,09 (0,81)	0,05 (0,86)	0,07 (0,81)	0,27 (0,38)	0,52 (0,11)	0,44 (0,17)	0,06 (0,86)
ОЛБ +МЛП	-0,08 (0,82)	-0,22 (0,53)	0,26 (0,46)	-0,03 (0,93)	0,3 (0,43)	-0,2 (0,7)	-0,46 (0,29)	0,07 (0,87)	-0,23 (0,65)	0,65 (0,16)	0,28 (0,45)
МЛП	0,5 (0,39)	-0,8 (0,10)	0,03 (0,95)	0,6 (0,28)	-0,2 (0,8)	0,9* (0,037)	-	0,1 (0,87)	-0,2 (0,74)	0,77 (0,072)	0,4 (0,6)

в скобках приведен уровень достоверности корреляции между показателями, указанными в начале столбцов. *- p<0,05; - значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена отсутствуют из-за малого количества образцов, в которых детектировались исследуемые показатели

Таким образом, разрабатываемый подход для выявления связи между рядом взаимозависимых генов, обеспечивающих клеточный гомеостаз и микроРНК, связанных с ними, свидетельствует, что возрастные изменения и мутационный груз могут увеличивать риск возникновения опухолей.

Вторая группа включала пациентов с раком предстательной железы до и после ЛТ при развитии радиационно-индуцированных циститов.

Был исследован спектр микроРНК (-107, -181а, -124, -21, -34а, -125в, -145 и др.). На рис. 2 представлены данные по содержанию miR-21 в крови пациентов до ЛТ, осложненных циститом.

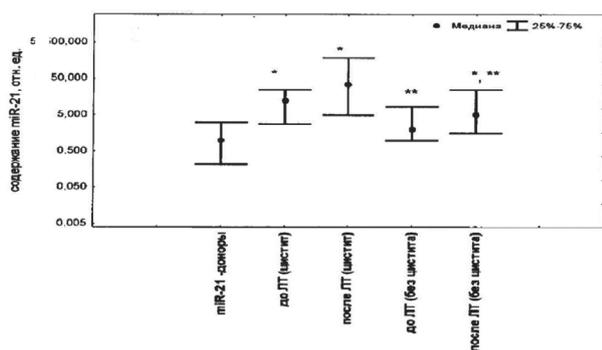


Рис. 2. Изменение экспрессии зрелых miR-21 в крови пациентов с раком предстательной железы до и после ЛТ при развитии циститов (данные представлены в логарифмическом масштабе и нормированы к группе «доноры», условно принятой за единицу). Обозначения: * Различия по сравнению с группой «доноры», ** различия между группами «циститы» и «без цистита», при уровне значимости p<0.05.

Медиана экспрессии miR-21 составляла 12,56 относительных единиц, что достоверно превышает аналогичный показатель в группе здоровых доноров и в группе пациентов без цистита. В группе пациентов после ЛТ, осложненных циститом, содержание этой микроРНК увеличивалось в 34,2 раза. Было также выявлено повышение содержания miR -21 после ЛТ, не осложненной циститом.

МикроРНК широко используются в настоящее время в целях диагностики и прогноза ряда патологий человека [14, 15, 16]. МикроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Каждая микроРНК может быть частично комплементарна последовательностям 3'-нетранслируемой области мРНК для различных генов и способна при взаимодействии подавлять их трансляцию. Однако их реальное взаимодействие зависит от многих факторов, таких как генотип клеток (нормальных или злокачественных), воздействие факторов внешней среды и др. Кроме этого в 3'-нетранслируемой области мРНК многих генов расположены участки, с которыми взаимодействуют сразу несколько различных микроРНК, что осложняет биоинформатический анализ. Более того, изменение экспрессии одной микроРНК может приводить как к активации, так и ингибированию внутриклеточной генетической программы в интактной клетке. Так, воздействие miR-125b может вызвать как активацию митохондриального пути апоптоза, так и его ингибирование, что определяется доступностью к взаимодействию с мРНК её генов-мишеней [17]. miR-21 является одной из наиболее высоко экспрессирующихся микроРНК во многих типах кле-

ток млекопитающих [18, 19]. Ее экспрессия усиливается при развитии многих патологий, включая онкологию, при сердечно-сосудистых и различных воспалительных заболеваниях [20]. Индукция синтеза зрелых miR-21 в моноцитах и макрофагах, а также в дендритных и Т-клетках при действии воспалительных стимулов хорошо установлена. В большинстве онкотрансформированных клеток также наблюдается гиперэкспрессия этой микроРНК [18]. Предполагается, что miR-21 является ключевым медиатором противовоспалительного ответа в макрофагах. Возможный механизм влияния высокого содержания miR-21 в крови на развитие воспалительных процессов в тканях с поврежденными клетками связан с тем, что miR-21 является антагонистом P53-зависимой системы сохранения стабильности генома [21]. miR-21 подавляет процессы апоптоза и способствует выживанию поврежденных, в том числе и раковых, клеток. Сохранение поврежденных клеток способствует образованию активных форм кислорода, снижению эффективности репарационных систем и активации воспалительных процессов. Это положение подтверждено прямыми опытами, в которых показано, что снижение содержания miR-21 приводит к увеличению радиочувствительности злокачественных клеток и их гибели [18]. Исходя из собственных экспериментальных данных о роли miR-21, можно сделать вывод о возможном прогнозировании, например, развития цистита еще до применения ЛТ.

Вместе с тем, в самое последнее время акцент исследований сместился к другому виду некодирующих РНК - длинным РНК (днРНК). В отличие от микроРНК, в состав которых входит примерно 20 нуклеотидов, днРНК состоят из 200 и более нуклеотидов, и число их в клетке около 15 тысяч (функционально в настоящее время охарактеризовано около 1 %). В зависимости от типа клеток и тканей днРНК регулируют экспрессию генов, либо облегчают взаимодействие белков, либо функционируют как молекулярные «ловушки» для белков. Таким образом, они модулируют и направляют комплексы, модифицируя хроматин, к локусам-мишеням ДНК. ДнРНК действуют как «губки», захватывая микроРНК и мРНК генов [22, 23]. При изучении роли днРНК при раке гортани были выявлены индивидуальные различия в уровнях экспрессии некоторых днРНК при 1-2 и 3-4 стадиях развития этой патологии (рис. 3).

Увеличение днРНК MALAT1 наблюдалось в крови у пациентов с ПРГ (рис. 3 А). Накопление MALAT1 и его взаимодействие с miR-124 способствует усилению пролиферативной способности клеток, а через регуляцию богатых пролином малых белков способствует их метастатической и инвазивной активности. С другой стороны, воздействуя на сигнальный путь Wnt/ β -catenin, MALAT1 также способен индуцировать апоптоз при ПРГ. В наших исследованиях не было отмечено увеличения днРНК ROR, хотя некоторые

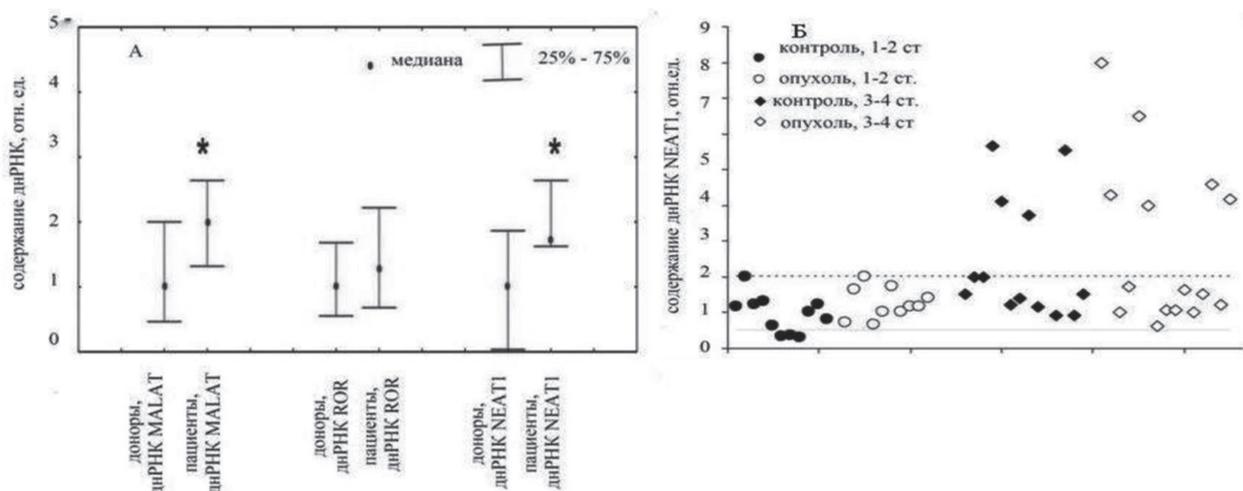


Рис.3. Экспрессия днРНК MALAT1, ROR, NEAT1 в крови у пациентов с плоскоклеточным раком гортани (А) и прогностическая значимость содержания днРНК NEAT1 в этих опухолях (Б). Обозначения: (А) Для крови, взятой у доноров (группы «доноры»), медиана каждого показателя принята за 1. (Б): Медиана показателей группы «нормальная ткань, окружающая опухоль 1-2 стадии» принята за единицу, и все исследуемые индивидуальные значения нормированы к этой медиане. Биоптат гистологически нормальной ткани, окружающей опухоль, обозначен как группа «контроль», а биоптат опухоли 1-2 стадии и опухоли 3-4 стадии обозначен «опухоль, 1-2 ст» и «опухоль, 3-4 ст».

авторы отмечают увеличение ее содержания при плоскоклеточных раках области головы и шеи. Во всяком случае отмечается возможность ингибирования при увеличении днРНК ROR активности P53-системы сохранения стабильности генома и как следствие - снижение эффективности химиотерапии [23].

Средняя выживаемость больных плоскоклеточным раком головы и шеи за пятилетний период составляет около 60 % и уменьшается с увеличением тяжести (стадии) на момент постановки диагноза, достигая 20 % у больных с метастазами. Если успешное лечение больных 1 стадии достигает 80 %, то выживаемость пациентов 3 стадии составляет 50 %, а 4 - 25%. ДнРНК NEAT1 является мишенью P53, который в опухолях рака гортани часто мутирован и может высоко экспрессироваться. Установлено, что высокое содержание днРНК NEAT1 в таких опухолях способствует клеточной миграции и метастазированию. Таким образом, гиперэкспрессия днРНК NEAT1 (рис. 3 Б) свидетельствуют о возможности использования этой днРНК для индивидуального прогноза заболевания при создании панели биомаркеров.

Следует отметить, что дифференцированная экспрессия микроРНК и днРНК связана с жизненно важными функциями клетки, осуществляемая генами, и приводит к изменению контроля клеточного цикла, сигнальных путей, апоптозу, влияет и на другие клеточные процессы. Ингибирование экспрессии генов на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях сопровождается огромным числом изменений функционирования клеточных компонентов и может служить подходом к таргетной терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие инновационных технологий и внедрение на их основе новых средств является одним из основных направлений, обеспечивающих сохранение и улучшение здоровья населения. Одними из новых биомедицинских продуктов являются регуляторные РНК, изменяющие экспрессию генов, задействованных в патогенезе различных заболеваний, в том числе и рака, и находящиеся сейчас на передовых позициях персонализированной медицины.

Хорошо известно, что воздействие ионизирующего излучения на человека может иметь серьезные последствия для здоровья и происходит не только в результате промышленных или экологических инцидентов, но и в медицинской

практике. Как показывают наши исследования по индуцированному радиацией циститу, коррекция содержания регуляторных РНК может снижать развитие неблагоприятных эффектов радиации.

Для онкологических заболеваний эффективность лечения и прогноз зависят от раннего выявления заболевания. Рак гортани занимает 5-е место в России по частоте встречаемости. Однако, около 70 % пациентов, заболевших раком гортани, выявляют на III и IV стадиях, имеющих плохой прогноз. Обнаруженные нами изменения регуляторных РНК P53-зависимой системы сохранения стабильности генома в гомогенате опухолей гортани, а также в периферической крови тех же пациентов свидетельствуют о перспективности использования этих показателей в клинических исследованиях.

Таким образом, проведенные нами исследования показывают, что изучение комплекса некодирующих РНК, регулирующих уровень экспрессии белок-кодирующих генов, определяющих пролиферативный статус и функционирование внутриклеточных систем, поддерживающих стабильность генома, может быть использовано для прогноза ранних и отдаленных последствий, возникающих после воздействия радиации. Необходимы дальнейшие работы по отбору информационно-значимых РНК-показателей для персонализированного применения в лечебной практике.

Работа выполнена по теме госзадания № 0112-2018-0005 «Эпигенетические и генетические маркеры отдаленных генотоксических воздействий и предрасположенность к широко распространенным заболеваниям» и при поддержке гранта РФФИ 16-03-00013

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bayoumi A., Sayed A., Broskova Z., Teoh JP, Wilson J., Su H., Tang YL, Kim I.M. // Int. J. Mol. Sci. 2016. V.17, pp.356-360.
2. Gupta S., Tripathi Y. // Int. J. Cancer. 2016. V.2, pp.37-46.
3. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Раева Н.Ф., Салеева Д.В., Незнанова М.В., Засухина Г.Д. // РАД. БИОЛ. РАДИОЭКОЛ. 2017. Т. 57. №6. С.598-607.
4. Yu Q., Li B., Li P., Shi Z., Vaughn A., Zhu L., Fu S. // Am.J.Transl.Res. 2015. V.7, pp. 2060-2071.
5. Засухина Г.Д., Михайлов В.Ф., Шуленина Л.В., Васильева И.М. // Цитология. 2017. Т. 59. №9. С. 563-573.
6. Ильин Л.А., Коренков И.П., Наркевич Б.Л. Радиационная гигиена. Москва, Гэотар-Медицина, 2017, 411с.

7. Yen P.N., Lin I.F., Chang W.P., Wang J.D., Chang T.C., Kuo K.L., Hwang J.S., Liu I.C., Chen Y.T., Yang C.C. // *Int. J. Radiat. Biol.* 2014. Vol.90, No10, pp.859-66.
8. He M., Zhou W., Li C., Guo M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol.17, No.12, pp. 2087-3001.
9. Sahu A., Sighal U., Chinnaiyan A. // *Trends Cancer.* 2015, Vol.1, pp. 93—109.
10. Шуленина Л. В., Галстян И. А., Надежина Н. М., Михайлов В. Ф., Раева Н. Ф. // *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2014. Т.10. №4. С. 749-753.
11. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Ледин Е.В., Раева Н.Ф., Засухина Г.Д. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2015, т.60, №1, С. 5-14.
12. Mikhailov V. F., Shishkina A. A., Vasilyeva I. M., Shulenina L. V., Raeva N. F., Rogozhin E. A., Startsev M. I., Zasukhina G. D., Gromov S. P., Alfimov M. V. *Russian Journal of Genetics,* 2015, Vol. 51, No. 2, pp. 130–137
13. Михайлов В. Ф., Шуленина Л. В., Васильева И. М., Старцев М. И., Засухина Г. Д. *Генетика,* 2017, Т. 53, № 3, с. 265–278
14. Medina P., Slack F. // *CellCycle.* 2008. Vol.7, No.16, pp. 2485-2492.
15. Joglekar M.V., Januszewski A.S., Jenkins A.J., Hardikar A.A. // *Diabetes.* 2016. Vol. 65, No.1, pp. 22-24.
16. Fauda M., Isin M., Tambas M., Guveli M., Meral R., Altun M., Shin D., Ozgan G., Sanli Y., Isin H., Ozgur E., Gezer U. // *Tumor Biol.* 2016. Vol. 37, pp. 3969-3978.
17. Sun Y., Lin K., Chen Y. // *J.Hematol.Oncol.* 2013. Vol.6, pp. 1-8.
18. Gwak H.S, Kim T.H, Jo G.H, Kim Y.J, Kwak H.J, Kim J.H, Yin J, Yoo H, Lee S.H, Park J.B.// *Cell Lines. PLoS ONE.* 2012. Vol.7, pp. 10e47449.
19. Zhang X., Ng W-L , Wang P. , Tian L.L. , Werner E., Wang H. , Doets P., Wang Y. // *Cancer Res.* 2012. Vol. 72, No.18, pp. 4707-4713.
20. Sheedy F.J. // *Front. Immunol.* 2015. Vol. 6, No.19, pp. 1-9.
21. Wang K., Chang H.// *Mol.Cell.* 2011. Vol.43, No.6, pp. 904-914.
22. Zhang B, Wang D, Wu J, Tang J, Chen W, Chen X, Zhang D, Deng Y, Guo M, Wang Y, Luo J, Chen R.// *Discov Med.* 2016. Vol.21, No116, pp. 239-250.
23. Li L, Gu M, You B, Shi S, Shan Y, Bao L, You Y. // *Cancer Science.* 2016. Vol.107, pp. 1215.

ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»

* Шуленина Л. В., канд. биол. наук, старший научный сотрудник

E-mail shulenina2010@mail.ru

Михайлов В. Ф., канд. биол. наук, зав. лабораторией
E-mail vfmi@mail.ru

Салеева Д. В., младший научный сотрудник
E-mail dasha_saleeva@inbox.ru

Незнанова М. В., младший научный сотрудник
E-mail mashaneznanova@inbox.ru

ФГБУН Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова

Васильева И. М., канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела экологической генетики
E-mail vasilyeva@vigg.ru

Засухина Г. Д., докт. мед., наук, профессор, главный научный сотрудник отдела экологической генетики
e-mail Zasukhina@vigg.ru

Center – A. I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency

*Shulenina L. V., PhD., senior research scientist
E-mail shulenina2010@mail.ru

Mikhailov V. F., PhD., Head of the Laboratory
E-mail vfmi@mail.ru

Saleeva D. V., junior research scientist
E-mail dasha_saleeva@inbox.ru

Neznanova M. V., junior research scientist
E-mail mashaneznanova@inbox.ru

N.I. Vavilov Institute of General Genetics
Vasilyeva I. M., PhD., senior research scientist,
Department of Ecological Genetics
e-mail vasilyeva@vigg.ru

Zasukhina G. D., MD. Full Professor, chief researcher of Department of Ecological Genetics
E-mail Zasukhina@vigg.ru

GENES- AND NONCODING RNA- EXPRESSION PROFILES IN TISSUE BIOPSTATS AND BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH DIFFERENT PATHOLOGY AFTER RADIATION EXPOSURE

L. V. Shulenina¹, V. F. Mikhailov¹, I. M. Vasilyeva², D. V. Saleeva¹,
M. V. Neznanova¹, G. D. Zasukhina²

¹State Research Center — A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center
of Federal Medical Biological Agency

²N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences

Annotation. The current task of modern biomedical research is the setting of indicators of the gene expression associated with various pathologies, including radiation genesis. In this paper, we systematized the results of our own molecular genetic studies on the connection of various RNA compounds (mRNA protein-coding genes, miRNA and long non-coding RNA) with long-term effects of radiation after acute radiation syndrome and local radiation injuries, radiation-induced cystitis in patients with prostate cancer, as well as the development of laryngeal cancer.

The expression levels of long RNA, miRNA, and mRNA genes were estimated using real-time PCR.

It was shown that there was a decrease of the content of miR-34a and miR-21 in the blood of patients after several decades of acute radiation syndrome. The loss of correlation between P53 and its MDM2 mRNA targets and miRNAs such as miR-34a, miR-145, and others was found in these patients indicates that an imbalance in the functioning of the P53-dependent system of maintain genome stability in the late period after radiation. It has been established that a significant increase of content miR-21 is observed before the course of radiotherapy in the blood of patients with prostate cancer, in whom cystitis occurs during radiotherapy. Thus, indicators of the expression level of protein coding genes, miRNA and long RNA can be used to predict complications after radiation therapy. Noncoding RNA and genes linked to them can serve as targets for targeted therapy.

Long noncoding RNAs regulate the gene expression depending on the cells type and tissues. We have shown a change in the content of long RNA (MALAT1, ROR, NEAT1) in laryngeal cancer. Differences in the expression level of long NEAT1 RNA in patients with laryngeal cancer of stages I-II and III-IV were revealed. The high level of NEAT1 in patients with III-IV stages, compared with stage I-II, indicates the possibility of using this compound in the formation of a indicators panel for assessing an individual prognosis that allows one to predict the nature of the disease.

Keywords: gene expression, miRNA, long non-coding RNA, ionizing radiation, acute radiation syndrome, prostate cancer, larynx cancer.

REFERENCES

1. Bayoumi A., Sayed A., Broskova Z., Teoh JP, Wilson J., Su H., Tang YL, Kim I.M., *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol.17, pp. 356-360 . DOI: 10.3390/ijms17030356
2. Gupta S., Tripathi Y. // *Int. J. Cancer.* 2016. V.2, pp37-46. DOI: 10.1002/ijc.30546.
3. Shulenina L.V., Mikhailov V.F., Raeva N.F., Saleeva D.V., Neznanova M.V., Zasukhina G.D., *Radiation Biol. Radiation ecol.*, 2017, Vol.57, No.6, pp. 598-607. DOI: 10.7868/S0869803117060042
4. Yu Q., Li B., Li P., Shi Z., Vaughn A., Zhu L., Fu S., *Am.J.Transl.Res.*, 2015, Vol.7, pp. 2060-2071.
5. Zasukhina G.D., Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Vasilyeva I.M., *Cytologia*, 2017, V.59, No.9, pp. 563-573.
6. Плин Л., Кореков И., Наркевич В. Radiation hygiene. Mjscow, Geotar- Medicin, 2017, 411p.
7. Yen P.N., Lin I.F., Chang W.P., Wang J.D., Chang T.C., Kuo K.L., Hwang J.S., Liu I.C., Chen Y.T., Yang C.C., *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014, Vol. 90, No.10, pp. 859-66. DOI: 10.3109/09553002.2014.916830.
8. He M., Zhou W., Li C., Guo M., *Int. J. Mol. Sci.* 2016, Vol.17, No.12, pp. 2087-3001. DOI: 10.3390 / ijms17122087
9. Sahu A., Sighal U., Chinnaiyan A., *Trends Cancer.* 2015, Vol.1, pp.93—109. DOI:10.1016/j.trecan.2015.08.010.
10. Shulenina L.V., Galstyin I.A., Nadezdina N.M., Mikhailov V.F., N. F. Raeva N. F., *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal*, 2014, Vol.10, No.4, pp.749-753.

11. Shulenina L.V., Mikhailov V.F., Ledin E.V., Raeva N. F., Zasukhina G.D. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2015, Vol.60, No1, pp.5-14.
12. Mikhailov V. F., Shishkina A. A., Vasilyeva I. M., Shulenina L. V., Raeva N. F., Rogozhin E. A., Startsev M. I., Zasukhina G. D., Gromov S. P., Alfimov M. V. *Russian Journal of Genetics*, 2015, Vol. 51, No. 2, pp. 130–137
13. Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Vasilyeva I. M., Zasukhina G. D. *Genetics*, 2017, Vol. 53, No. 3, pp. 265–278
14. Medina P., Slack F., *CellCycle*. 2008, Vol.7, No.16, pp. 2485–2492. DOI:10,4161 /cc.7.16.6453,
15. Joglekar M.V., Januszewski A.S., Jenkins A.J., Hardikar A.A., *Diabetes*, 2016, Vol. 65, No.1, pp. 22-24. DOI:10,2337 / dbi15-0028
16. Fauda M., Isin M., Tambas M., Guveli M., Meral R., Altun M., Shin D., Ozgan G., Sanli Y., Isin H., Ozgur E., Gezer U., *Tumor Biol.*, 2016, Vol. 37, pp. 3969-3978. DOI: 1007/s13277-015-4189-1
17. Sun Y., Lin K., Chen Y., *J.Hematol.Oncol.*, 2013, Vol.6, pp. 1-8. DOI: 10,1186 / 1756-8722-6-6
18. Gwak H.S, Kim T.H, Jo G.H, Kim Y.J, Kwak H.J, Kim J.H, Yin J, Yoo H, Lee S.H, Park J.B., *Cell Lines.PLoS ONE*, 2012, Vol.7, pp. 10e47449. DOI:10.1371/journal.pone.0047449.
19. Zhang X., Ng W-L , Wang P. , Tian L.L. , Werner E., Wang H. , Doets P., Wang Y., *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, No.18, pp. 4707-4713. DOI: 10.1158 / 0008-5472.CAN-12-0639
20. Sheedy F.J., *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, No.19, pp. 1-9. DOI:10,3389 / fimmu.2015.0001918Pan et.al.,2010
21. Wang K., Chang H., *Mol.Cell.*, 2011, Vol.43, No.6, pp. 904-914. DOI:10,1016 / j.molcel.2011.08.018
22. Zhang B, Wang D, Wu J, Tang J, Chen W, Chen X, Zhang D, Deng Y, Guo M, Wang Y, Luo J, Chen R., *Discov Med.*, 2016, Vol.21, No.116, pp. 239-250.
23. Li L, Gu M, You B, Shi S, Shan Y, Bao L, You Y., *Cancer Science*, 2016, Vol.107, pp. 1215. DOI: 10.1111 / cas.12989.