

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

РИТТЕР ГЕНРИХ СЕРГЕЕВИЧ

**Изучение клеточных и молекулярных механизмов
радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *Saccharomyces
cerevisiae***

1.5.22. – Клеточная биология

диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Богачев С. С.

Новосибирск, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Молекулярные и клеточные характеристики механизмов и принципов радиопротекторного действия.....	11
1.1.1. Механизмы воздействия ионизирующего излучения на живые организмы.....	11
1.1.2. Радиопротекторы. Принципы действия радиопротекторов	14
1.1.3. Механизмы радиопротекторного действия.....	16
1.2. Действие ионизирующего излучения на ядерную ДНК, как особый фактор индукции гибели эукариотической клетки. Репарация двуцепочечных разрывов.....	20
1.2.1. Выбор пути репарации	24
1.3. Характеристика иницирующего репаративный процесс событий	25
1.4. Интернализация нуклеиновых кислот в эукариотическую клетку. Механизмы, факторы	29
1.5. Участие экстраклеточных нуклеиновых кислот в репаративных процессах, протекающих в эукариотической клетке	33
1.6. Естественный захват фрагментов экстраклеточных нуклеиновых кислот стволовыми клетками – новый общебиологический феномен как основа их радиопротекторного действия	40
1.7. Заключение к литературному обзору	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1. Экспериментальные животные	42
2.2. Обработка мышей радиопротекторными препаратами	42
2.3. Облучение экспериментальных животных	42
2.4. Подготовка препарата дцРНК	42
2.5. Качественная реакция на ДНК (реакция Дише)	43
2.6. Определение содержания ДНК по Спирину.....	43
2.7. Клонирование и секвенирование молекул РНК, элюирующихся с гидроксиапатита 0,25 М PBS	44
2.8. Контекстный анализ рекомбинантных клонов. Определение генной принадлежности полученных структур	44
2.9. Рехроматография двуцепочечной фракции РНК.....	44
2.10. Выделение клеток костного мозга	45
2.11. Выделение клеток Кребс-2	45
2.12. Нарботка Alu I фрагмента, меченного TAMRA флуорохромом.....	45
2.13. Создание искусственной последовательности РНК.....	46
2.14. Включение метки на 5'-конец FAM-дцРНК с помощью полинуклеотидкиназы фага T4.....	46
2.15. Отжиг комплементарных цепей искусственно синтезированной молекулы РНК.....	47
2.16. In vitro интернализация меченой нуклеиновой кислоты в клетки костного мозга и клетки Кребс-2.....	47
2.17. In vitro обработка антителами к c-Kit и CD34 клеток костного мозга и Кребс-2	47
2.18. Анализ двуцепочечных разрывов ДНК при помощи антител к гистону γ -H2aX	47
2.19. Патоморфологический анализ органов	48
2.20. Подсчет лимфоцитарных колоний в селезенках мышей	48
2.21. Анализ функционального состояния гемопоэтических ростков клеток костного мозга	48
2.22. Анализ динамики накопления дцРНК-зонда в клетках in vitro	48
2.23. Анализ деградации двуцепочечной и одноцепочечной РНК в плазме крови человека и мыши.....	49
2.24. Анализ деградации двуцепочечной РНК в крови мыши in vivo.....	49
2.25. Стимуляция колониеобразования примитивных гемопоэтических предшественников препаратом дцРНК на метилцеллюлозе	49

2.26. Анализ внутриклеточной локализации флуорохромной метки (дцРНК) при помощи DIC/флуоресцентной-микроскопии	50
2.27. Электрофорез клеток Кребс-2 в свободном объеме.....	50
2.28. Гель-электрофорез клеток Кребс-2 в свободном объеме	50
2.29. Обработка клеток Кребс-2 катионным красителем BasicBlue41	51
2.30. Ингибирование интернализации дцРНК в клетки Кребс-2 гепарином.....	51
2.31. Анализ крови мышей после облучения.....	51
2.32. Анализ мутагенной активности препарата дцРНК.....	52
2.33. Выделение фактора связывания дцРНК при помощи биотинилированного P32-дцРНК зонда.....	52
2.34. Анализ интернализации P32-дцРНК-зонда в клетки и ядра клеток Кребс-2	52
2.35. Выделение РНК из клеток тризолом	53
2.36. Анализ накопления радиоактивно меченного материала в тканях и органах экспериментальных животных после внутривенного введения P32-дцРНК.....	53
2.37. Обработка клеток ингибиторами эндоцитоза.....	53
2.38. Оценка динамики ДЦР по относительному количеству гистона γ -H2AX.....	54
2.39. Оценка относительного количества белков XRCC4 и RAD51 в клетках костного мозга облученных мышей	54
2.40. Введение препарата Б-190	55
2.41. Статистическая обработка.....	55
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	56
Часть I. Поиск и характеристика активной субстанции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей ее радиозащитные свойства	56
3.1. Эффект пролонгированного радиопротекторного действия препарата дрожжевой РНК..	56
3.2. Радиопротекторное действие двух фракций дрожжевой РНК.....	57
3.3. Характеристика типа нуклеиновых кислот, составляющих фракцию 0,25 М	59
3.4. Клонирование фрагментов двуцепочечной РНК фракции «0,25 М». Анализ нуклеотидных последовательностей полученных клонов	62
3.5. Изменение радиозащитных свойств препарата РНК при «денатурации» и «ренатурации» и обработке РНКазой А в биологических тестах	64
3.6. Заключение по первой части исследования.....	67
Часть II. Поиск и характеристика клеточной мишени, воздействие на которую обуславливает радиозащитный эффект дцРНК, выделенной из дрожжей <i>S. cerevisiae</i> . Модель радиопротекторного действия препарата дцРНК.....	67
3.7. Устойчивость молекул двуцепочечной РНК к деградации нуклеазами крови и их распределение по органам	68
3.8. С-kit низкокодифференцированные гемопоэтические предшественники и мультипотентные прогениторы CD34+ мышей способны интернализировать FAM-меченый материал. Обработка клеток костного мозга искусственной дцРНК стимулирует колониеобразование гемопоэтическими предшественниками	70
3.9. Анализ количества и состояния форменных элементов крови у мышей, обработанных препаратами РНК и получивших сублетальную дозу γ -радиации 8 Гр.....	72
3.9.1. Характеристика формулы крови экспериментальных мышей в динамике на протяжении 37 суток наблюдения.....	72
3.9.2. Патологические изменения морфологии клеток	77
3.9.2.1. Патологические изменения морфологии клеток белого ростка кроветворения.....	77
3.9.2.2. Апоптоз	78
3.9.2.3. Патологические изменения общей морфологии клеток, нехарактерные для клеток крови.....	79
3.9.2.4. Патологические изменения морфологии клеток красного ростка кроветворения....	80
3.9.2.5. Миело- и эритропоэз.....	81
3.9.2.6. Оценка мутагенной активности дцРНК.....	82

3.10. Определение критического органа хоуминга FAM+ ГСК.....	84
3.11. Анализ развития селезеночных колоний после проведенного летального облучения	85
3.12. Заключение по второй части исследования	86
Часть III. Доказательство интернализации фрагментов дцРНК в эукариотическую клетку.	
Экстраполяция данных на ГСК.....	87
3.13. Сравнительный анализ интернализации FAM-дцРНК и TAMRA-дцДНК в CD34+ клетки Кребс-2.....	87
3.14. Характеристика некоторых элементов процесса интернализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда в клетки Кребс-2.....	90
3.14.1. Определение моды взаимодействия FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда с факторами поверхности клетки.....	90
3.14.1.1. Гель-электрофорез клеток Кребс-2 в свободном объеме с последующей оценкой количества клеток, интернализирующих FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, у противоположных полюсов электрофоретической камеры	91
3.14.1.2. Оценка моды интернализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда с использованием специфического положительно заряженного красителя Basic Blue 41	92
3.14.1.3. Оценка заряда клеток, интернализирующих FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, с использованием гепарина	94
3.14.1.4. Характеристика изменений пространственного положения FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда в клетках Кребс-2 после проведенного микрогель-электрофореза.....	94
3.14.2. Прямое доказательство интернализации искусственной дцРНК в эукариотическую клетку (на примере клеток карциномы Кребс-2).....	96
3.14.3. Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на содержание FAM+ клеток Кребс-2.....	98
3.15. Общий вывод по интернализации дцРНК в низкодифференцированную эукариотическую клетку. Экстраполяция на ГСК	100
Часть IV. Предположительная модель участия молекул дцРНК в репарации аварийных и сложных двуцепочечных разрывов	
3.16. Модель молекулярного механизма радиозащитного действия препарата дцРНК	100
3.17. Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата дцРНК и штатного радиопротектора Б-190	104
3.18. Общее заключение по исследованию	108
4. ОБСУЖДЕНИЕ	109
4.1. Радиозащитные свойства препарата РНК определяются присутствием в нем двуцепочечной формы РНК молекул	109
4.2. Определение клеток-мишеней, ответственных за радиопротекторные свойства двуцепочечной РНК	111
4.3. Модель механизма радиопротекторного действия препарата фрагментированной дцРНК, выделенной из препарата суммарной РНК <i>S. cerevisiae</i>	112
4.4. Молекулярные механизмы радиопротекторного действия дцРНК	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ATM – Ataxia telangiectasia mutated – иерархическая протеинкиназа эукариот; индуцирует каскад событий в ответ на ДЦР, остановку репликативной вилки, общее изменение структуры хроматина высших порядков
- ATR – Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein – иерархическая протеинкиназа высших эукариот; активируется при нарушениях, связанных с остановкой репликативной вилки
- CDC – фосфатаза, активирующая CDK путем дефосфорилирования
- CDK – циклинзависимые киназы, группа белков, регулируемых циклином и циклиноподобными молекулами. Большинство циклинзависимых киназ участвуют в смене фаз клеточного цикла; также они регулируют транскрипцию и процессинг мРНК
- Chk1 – Checkpoint kinase 1 – фермент регулирующий клеточный цикл и ответ на повреждение ДНК
- Chk2 – Checkpoint kinase 2 – фермент регулирующий клеточный цикл и ответ на повреждение ДНК
- DAPCO – «антифэйд», торговое название
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole – 4',6-диамидино-2-фенилиндол. Краситель ядерной ДНК, селективно связывающийся с ДНК на А-Т обогащённых участках
- DEPC – Diethyl pyrocarbonate – Диэтилпирокарбонат, ингибитор рибонуклеаз
- DNA-ПК – ДНК-зависимая протеинкиназа
- DOP-ПЦР – Degenerate Oligonucleotide Primer PCR – полимеразная цепная реакция с вырожденными праймерами
- hTDP1 – Human Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 – белок, участвующий в процессах ДЦР
- FACS – Fluorescence-activated cell sorting
- HUS1 – Checkpoint protein – белок, входящий в комплекс, представляющий собой «скользящую застежку»; является сенсором возникающих повреждений
- H2AX – гистон, фосфорилируемый при ДЦР. В наших исследованиях используется как маркер появления ДЦР
- KAT5 – Histone acetyltransferase – ацетилтрансфераза, которая ацетирует ATM, запуская таким образом репарацию ДЦР
- Ku70/Ku80 – гетеродимерный белковый комплекс, который связывается с ДНК в месте разрыва и DNA-ПКcs
- LPA – линейный полиакриламид, инертный «осадитель» для малого количества или коротких последовательностей нуклеиновых кислот
- MCF-7 – культура клеток аденокарциномы молочной железы человека
- MDC1 – Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 – белок контроля клеточного цикла. Способствует экспрессии генов белков репарации
- MRE 11 – белок репарации двойных разрывов нитей, белок комплекса MRN
- MRN – комплекс белков, продуктов генов человека Rad50/Mre11/Nbs1; участвует в поддержании геномной стабильности, жизнеспособности клетки и активации сигналов контроля клеточного цикла
- NF-κB – ядерный фактор, универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла.
- NHEJ – non-homologous end joining – негомологичное объединение концов
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PIKK – Phosphatidylinositide 3-kinases – семейство Ser/Thr-протеинкиназ
- RAD1, RAD9 – белки репарации
- RAD17 – фактор, ассоциирующий комплекс Rad1-Rad9-Hus1 с aberrантной ДНК
- RAD50/RAD59 – белки гомологичной рекомбинации
- RAD51 – белок рекомбинации, формирующий филамент с одноцепочечным участком конца разорванной молекулы ДНК, процессированного после возникновения ДЦР
- RAD52 – фактор, отвечающий за инвазию цепи и формирование гетеродуплекса
- RAD54 – фактор, отвечающий за поиск гомологии по геному
- RFC2 – Replication factor C subunit 2 – фактор активации ATR

RPA – репликативный белок A, связывается с одноцепочечной ДНК и удерживает ее в таком состоянии

RPMI-1640 – питательная среда, используемая для культивирования клеток (Gibco Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium)

p53 – Tumor protein – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл

p62 – белок, участвующий в аутофагии. По нему можно оценить активность аутофагии

TAMRA – Carboxytetramethylrhodamine – флуорохромный краситель

TE – буфер (10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA)

TLR – Toll-like receptor – Белок рецепторы, связывающие традиционные патогенные лиганды

TOPBP1 – DNA topoisomerase 2-binding protein 1 – вспомогательный белок топоизомеразы 2

TRIF – адаптерный белок TLR, активирует NF-кВ

TSP1 – тромбоспондин 1

TP53BP1 – Tumor suppressor p53-binding protein 1 – белок, связывающий p53 в процессе NHEJ

XRCC4 – фактор NHEJ

WRN – ДНК геликаза

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ДЦР – двуцепочечный разрыв

дцДНК – двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота

дцРНК – двуцепочечная рибонуклеиновая кислота

ИЛ – интерлейкин

кДНК – комплементарная ДНК; ДНК, синтезированная на матрице мРНК

ЛД – летальная доза

СД – смертельная доза

TE – буферный раствор, содержащий 10 mM Трис-НСl и 10 mM ЭДТА

ФИД – фактор изменения дозы (ФИД = СД₅₀ с препаратом (опыт) / СД₅₀ без препарата (контроль))

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

В современном мире радиобиологическая безопасность имеет не только фундаментальное, но и практическое значение. Масштабное использование атомной энергии в промышленности, использование высокодозового облучения в медицине, применение облучения при создании продуктивных сортов зерновых культур, исследование космоса, а также сохраняющаяся угроза военного конфликта с применением ядерного оружия представляют потенциальную опасность для нынешнего и будущих поколений россиян. В этой связи очевидна необходимость защиты человека от воздействия ионизирующих излучений в различных жизненных ситуациях: при ликвидации последствий аварий на атомных установках, в космических экспедициях, в случае военного конфликта с применением ядерного оружия. Это означает, что поиск эффективных, не токсичных веществ, обладающих радиопротекторными свойствами, остается одной из приоритетных задач.

Ранее было показано, что нуклеиновые кислоты и, в частности, фрагментированная двуцепочечная ДНК (дцДНК), обладают радиопротекторным свойством. Считается, что радиозащитное действие экзогенной экстраклеточной ДНК связано с восстановлением структуры ядерной ДНК, поврежденной ионизирующим излучением в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) [Likhacheva et al., 2007 b]. К сожалению, препараты дцДНК легко подвергаются нуклеазной деградации в организме (плазма крови [Николин и др., 2006], кишечник), и в этой связи фрагментированная дцДНК без дополнительных дорогостоящих модификаций не может быть использована в качестве стабильного радиопротекторного препарата.

Научная новизна

В настоящем исследовании охарактеризован новый радиопротектор – препарат двуцепочечной РНК (дцРНК), полученный из суммарной РНК пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В рамках работы была определена мишень радиозащитного действия препарата дцРНК, разработана модель механизма радиопротекторного действия нового препарата и экспериментально доказаны основные её положения.

Теоретическая и практическая значимость

В исследовании охарактеризован новый радиопротекторный препарат с новым принципом действия. При создании технологии масштабного производства новый радиопротектор может быть использован для нужд Российской Федерации в военной сфере, в

области атомной энергетики и в качестве радиозащитного средства пролонгированного действия населением России при чрезвычайных обстоятельствах, связанных с ядерной угрозой.

Разработка нового радиопротектора включает три принципиальных этапа. На первом этапе необходимо экспериментально обосновать радиопротекторные свойства нового радиозащитного препарата, определить мишень, отвечающую за радиопротекторные свойства, получить лабораторный образец нового радиопротектора и определить его место в линейке существующих штатных радиопротекторов. Второй этап представляет собой совокупность работ технологического характера, на котором создается технический регламент получения активной субстанции в промышленных количествах, создается площадка для ее наработки и проводится комплекс мероприятий по подтверждению радиопротекторных свойств нового препарата в условиях, приближенных к реальным. На третьем этапе проводится регистрация нового радиопротекторного препарата, после чего новый радиопротектор вводится в штатный список специализированных препаратов соответствующих государственных структур.

Настоящее исследование является первым этапом разработки нового препарата, обладающего уникальными радиопротекторными свойствами.

В рамках проведенного исследования описан новый общебиологический феномен: низкодифференцированные стволовые клетки различного генеза способны интернализировать дцРНК естественным механизмом эндоцитоза. Данное открытие может дать начало новому направлению исследований в вопросах роли нуклеиновых кислот в биологических механизмах, определяющих существование клетки.

Положения, выносимые на защиту

1. Двухцепочечная РНК (дцРНК), полученная из тотальной РНК дрожжей *S. cerevisiae*, при внутривенном введении экспериментальным мышам, достигает внутренних компартментов гемопоэтических стволовых клеток в не деградированной форме, и, в случае последующего облучения животного летальной дозой радиации, способствует сохранению жизнеспособности этих клеток, а также индуцирует их пролиферацию и выход в кровоток.
2. Гемопоэтические стволовые клетки, циркулирующие в кровотоке и сохранившие жизнеспособность после облучения, фиксируются в опустошенной паренхиме селезенки, где образуют герминативные центры пролиферации форменных элементов крови, обеспечивающие быстрое восстановление популяции клеток иммунной и кроветворной систем.
3. Двухцепочечная форма и открытые концы молекул являются факторами, определяющими радиопротекторный эффект дцРНК, при ее взаимодействии с

низкодифференцированными предшественниками гемопоэтических клеток крови, в частности, c-Kit/CD34.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является изучение клеточных и молекулярных механизмов радиопротекторного действия двуцепочечной РНК *S. cerevisiae*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить временные параметры радиопротекторного действия препарата РНК, полученного из пекарских дрожжей *S. cerevisiae*.
2. Установить активную субстанцию препарата суммарной РНК дрожжей, определяющую его радиопротекторные свойства.
3. Изучить механизм радиопротекторного действия препарата дцРНК.
4. Сравнить в прямом эксперименте эффективность радиозащитного действия штатного радиопротектора Б-190 и нового радиопротектора – препарата дцРНК.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

К настоящему времени в мире накоплен огромный объем материалов по изучению острой лучевой болезни. Собраны и детально проанализированы отчеты последствий ядерных взрывов в Хиросиме и Нагасаки и практически всех известных в США, Японии и других западных странах радиационных аварий, а также аварий на Чернобыльской АЭС и ПО «Маяк» [Гуськова и Байсоголов, 1971; Gusev, Guskova and Mettler, 2001; Ильин и Соловьев, 2004; McLaughlin et al., 2000]

В отчетах и публикациях, находящихся в свободном доступе, детально описаны клинические последствия воздействия предельных доз γ -радиации на человека, классифицированы степени радиационного поражения и клинические проявления острой и хронической лучевой болезни [Гуськова и Байсоголов, 1971; Thoma and Wald, 1959; Селидовкин и др., 2001; Goans et al., 2001; Baranov et al., 1990; Baranov et al., 1995; Friessecke et al., 1999; Гуськова и др., 1987].

Известно, что в результате кратковременного (от нескольких секунд до трех суток) воздействия летальных доз ионизирующего излучения, в организме человека (млекопитающих) развивается костномозговая форма острой лучевой болезни. В её течении выделяют первичную реакцию, скрытый период и период разгара болезни. Первичная реакция возникает сразу после облучения и длится до 2 суток. Её сопровождают головная боль, кратковременный нейтрофильный лейкоцитоз, лимфопения и повреждение нервных и гормональных механизмов регуляции функций организма, что приводит к сбоям в работе вегетативной системы. Скрытый период продолжается 3-10 дней и характеризуется улучшением общего состояния облученного. Тем временем вследствие повреждения костного мозга и лимфоидного аппарата продолжают нарастать изменения в системе кроветворения. Лейкоцитоз сменяется лейкопенией, нарастает лимфопения, затем появляются тромбоцитопения и другие изменения системы кроветворения. Период разгара болезни длится от нескольких дней до 2-3 недель. В это время состояние больного вновь ухудшается – нарастает общая слабость, повышается температура тела, появляется кровоточивость, в результате чего возникают кровоизлияния на коже и слизистых, а также во внутренних органах. Характерно истощение гемопоэза, в тяжелых случаях до полного опустошения кроветворной системы вследствие гибели стволовых клеток. Количество лейкоцитов и тромбоцитов в крови резко падает. Возникает ряд эндокринных нарушений и нарушений функции нервной системы. Резко снижается иммунитет, в результате чего легко возникают инфекционные заболевания, аутоинфекция и аутоинтоксикация. Больной гибнет в пик заболевания.

Известные штатные радиозащитные средства способствуют защите гемопоэтической системы организма за счет создания условий, способствующих снижению разрушительного

действия свободных радикалов, образующихся в результате действия облучения. В настоящем исследовании описывается совершенно новый принцип радиопротекторного действия, не связанный с защитой от непосредственно γ -кванта, не связанный с ограничением воздействия оксидативного стресса, вызываемого вторичными радикалами, а характеризующийся успешным восстановлением жизнеспособности стволовых гемопоэтических предшественников, связанным, судя по всему, с участием фрагментов экстраклеточной двуцепочечной нуклеиновой кислоты в репарации повреждений хроматина, вызванных радиацией. Такое введение в репаративный процесс внешнего «корректора» в конечном итоге определяет восстановление кроветворной и иммунной системы облученного организма.

В этой связи в структуру литературного обзора были введены главы, характеризующие: а) механизмы и общие принципы радиопротекции; б) общие представления о репаративном процессе негомологичного объединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), характерном для репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР), вызываемых γ -радиацией; в) факторы и механизмы интернализации экстраклеточных двуцепочечных нуклеиновых кислот во внутренние компартменты эукариотической клетки. Рассматриваются известные литературные данные об участии экстраклеточных нуклеиновых кислот в репаративных процессах, протекающих в клетке. В заключении литературного обзора приводятся данные, полученные в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН, о взаимодействии экстраклеточной двуцепочечной ДНК с низкодифференцированными клетками различного происхождения.

1.1. Молекулярные и клеточные характеристики механизмов и принципов радиопротекторного действия

1.1.1. Механизмы воздействия ионизирующего излучения на живые организмы

Ионизирующее излучение воздействует на живые организмы таким образом, что приводит к повреждению его функциональных систем и гибели. Первичное действие ионизирующего излучения разрушает клетку, как живую систему, что губительно отражается на состоянии целого организма.

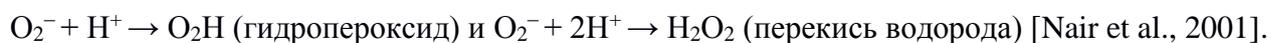
Ионизирующие излучения получили свое название ввиду способности вызывать ионизацию атомов и молекул облучаемого вещества. При прохождении через вещество ионизирующее излучение способствует отрыву электронов от атомов и молекул, благодаря чему возникают ионные пары. По характеру взаимодействия с веществом ионизирующие излучения делятся на прямо и косвенно ионизирующие.

Первый тип взаимодействия характеризуется прямой атакой на молекулу-мишень ионизирующих частиц – электронов, протонов и альфа-частиц.

Второй тип взаимодействия характеризуется атакой на молекулу-мишень активных продуктов (например, радикалов), образовавшихся из других молекул в результате их непосредственного взаимодействия с ионизирующими частицами. В этом случае повреждение молекулы-мишени происходит в результате непрямого (или косвенного) действия излучения. К излучениям, характеризующимся косвенным воздействием на живые системы, относятся электромагнитные рентгеновское и γ -излучение, а также корпускулярное излучение нейтронов, не несущих электрического заряда.

Механизмы, ведущие к ионизации и возбуждению атомов облучаемого вещества, достаточно хорошо изучены и детально описаны в доступных литературных источниках. Однако, немного известно о связи между химическими и биомолекулярными изменениями и последующими биологическими эффектами, индуцируемыми радиацией [Вернигорова, 1990].

В живых тканях основным субстратом является вода, выступающая в качестве основного растворителя наибольшей части неорганических и органических соединений, играющих роль в обмене веществ. В связи с этим появилась концепция о роли ионизации частиц воды (непрямое действие). В облученных водных растворах возникает возможность окислительно-восстановительных реакций. При наличии в среде свободного растворенного O_2 «выбитые» электроны приводят к образованию ионов O^+ и O^- . Эти ионы, сочетаясь с H^+ , дают следующие реакции:



Как уже было сказано, первичные процессы ионизации не вызывают больших нарушений в живых тканях. Влияние ионизирующего излучения на клетки обусловлено взаимодействием свободных радикалов с молекулами белков, нуклеиновых кислот и липидов, когда вследствие всех этих процессов образуются органические перекиси и возникают быстропротекающие реакции окисления. Повреждающее действие излучения связано, по-видимому, с вторичными реакциями, при которых происходит разрыв связей внутри сложных органических молекул, например, SH-групп в белках, хромофорных групп азотистых оснований в ДНК, ненасыщенных связей в липидах и пр. В результате перекисного окисления накапливается множество измененных молекул, в результате чего начальный радиационный эффект многократно усиливается. Все это отражается, прежде всего, на структуре биологических мембран: меняются их сорбционные свойства, и повышается проницаемость (в том числе мембран лизосом и митохондрий). Изменения в мембранах лизосом приводят к освобождению и активации ДНК-аз, РНК-аз, катепсинов, фосфатаз, ферментов гидролиза мукополисахаридов и ряда других ферментов. Под действием этих ферментов происходит дальнейший распад макромолекулярных компонентов клетки, в том числе нуклеиновых кислот, белков. Разобщение окислительного фосфорилирования в результате выхода ряда ферментов из митохондрий в свою очередь

приводит к угнетению синтеза АТФ, а отсюда и к нарушению биосинтеза белков. Иными словами, активируется катаболический процесс. Таким образом, в основе радиационного поражения клетки лежит нарушение ультраструктур клеточных органелл и связанные с этим изменения обмена веществ. Кроме того, ионизирующая радиация вызывает образование в тканях организма целого комплекса токсических продуктов, усиливающих лучевой эффект, так называемых радиотоксинов. Среди них наибольшей активностью обладают продукты окисления липидов, перекиси, эпоксиды, альдегиды и кетоны. В настоящее время считается, что ионизирующее излучение оказывает наибольшее воздействие на ядро клетки, угнетая митотическую активность и нарушая интегральную функциональную целостность хроматина. Нарушения ядерной ДНК ведут к атипическому течению клеточного деления, появлению хромосомных aberrаций и апоптозу [Dent et al., 2003].

Ионизирующее излучение действует на клетки тем сильнее, чем они моложе и чем менее дифференцированы. В 1906 г. Bergonie и Tribondeau сформулировали основной радиобиологический закон, согласно которому ткани с малодифференцированными и активно делящимися клетками относятся к радиочувствительным, а ткани с дифференцированными и слабо или вообще не делящимися клетками – к радиорезистентным. По этой классификации кроветворные клетки костного мозга, зародышевые клетки семенников, кишечный и кожный эпителий являются радиочувствительными, а мозг, мышцы, печень, почки, кости, хрящи и связки – радиорезистентными [Bergonie and Tribondeau, 2003; Vogin and Foray, 2013].

Повреждающее действие ионизирующего излучения на клетки при достаточно высоких дозах завершается их гибелью. В результате происходит опустошение тканей из-за того, что не восполняется естественная убыль клеток за счет образования новых. Гибель клеток от ионизирующего излучения и «клеточное опустошение» тканей (в первую очередь крови) играют принципиальную роль в индукции общих поражений организма и развитии лучевой болезни.

Радиочувствительность всего организма у млекопитающих приравнивается к радиочувствительности кроветворных клеток, так как их аплазия, возникающая после общего облучения минимальной абсолютно смертельной дозой (СД), приводит к гибели организма. При оценке радиочувствительности организма и анализе эффективности радиопротекторов учитываются дозы облучения, вызывающие конкретный летальный исход. Сублетальная доза не приводит к гибели ни одного животного из облученной группы. Летальная доза (ЛД) вызывает смерть минимально одной, а максимально всех облученных особей. Эта величина характеризуется процентом погибших особей в группе к определенному сроку после облучения. В эксперименте чаще всего применяется средняя летальная доза (гибель 50% животных к 30-м или 90-м суткам) – ЛД_{50/30} или ЛД_{50/90}. Минимальная абсолютно летальная доза — это доза, при которой погибают все особи из облученной группы.

1.1.2. Радиопротекторы. Принципы действия радиопротекторов

Под радиозащитным или радиопротекторным эффектом понимают снижение частоты и тяжести постлучевых повреждений биомолекул и (или) стимуляцию процессов их пострadiационной репарации. К радиопротекторам относятся вещества, которые при профилактическом применении способны оказывать защитное действие, проявляющееся в сохранении жизни облученного организма или ослаблении степени тяжести лучевого поражения с пролонгацией состояния дееспособности и сроков жизни [Cole et al., 1952]. Противолучевой эффект радиопротекторов развивается в первые минуты или часы после введения, сохраняется на протяжении относительно небольших сроков (до 2-6 ч) и проявляется, как правило, в условиях импульсного и других видов острого облучения. Действие радиопротекторов направлено, прежде всего, на защиту костного мозга и других гемопоэтических тканей, поэтому препараты этой группы целесообразно применять для профилактики поражений, вызываемых облучением в «костномозговом» диапазоне доз (1-10 Гр).

Радиозащитная активность радиопротекторов оценивается обычно в единицах так называемого «фактора изменения дозы» (ФИД), представляющего собой отношение доз, вызывающих равнозначный биологический эффект при использовании препарата и в облученном контроле. Если в качестве критерия биологического эффекта используется 50% летальность, то ФИД представляет собой отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат особей, к дозе того же излучения, смертельной для половины особей незащищенной группы:

$$\text{ФИД} = \text{СД}_{50} \text{ с препаратом (опыт)} / \text{СД}_{50} \text{ без препарата (контроль)}.$$

У препаратов, оказывающих при профилактическом введении радиозащитный эффект, то есть у радиопротекторов, показатель ФИД больше единицы. Препараты, способствующие увеличению летальности облученных особей (радиосенсибилизаторы), имеют ФИД меньше единицы.

Другими показателями эффективности радиопротекторов являются продолжительность радиозащитного эффекта и терапевтическая широта: отношение дозы препарата, вызывающей смертельную интоксикацию, к оптимальной радиозащитной дозе. Чем больше терапевтическая широта, тем меньше нежелательных побочных эффектов, и тем меньше препарат снижает дееспособность получивших его людей.

Условно радиопротекторы можно разбить на две группы: 1) радиопротекторы кратковременного, одномоментного действия, которые вводят в организм за короткий промежуток времени до облучения; 2) радиопротекторы пролонгированного действия, которые вводят многократно, обычно небольшими дозами до лучевого воздействия.

Впервые радиозащитные свойства были открыты у аминокислот (цистеин, глутатион, цистеамин и его дисульфид цистамин) и вазоактивных аминов (серотонин, норадреналин, гистамин и др.) [Patt et al., 1949; Fridovich, 1995]. Последующие многолетние исследования по изысканию препаратов, обладающих профилактическим противолучевым действием, показали, что наиболее эффективные радиопротекторы относятся, как правило, к двум классам химических соединений:

а) серосодержащие радиозащитные вещества: аминокислоты (2-аминоэтиллизотиуранит, 2-аминоэтилтиазолин, 2-аминоэтилтиофосфат, 3-аминопропил-2-аминоэтилтиофосфат и др.);

б) производные индолилалкиламинов: агонисты биологически активных аминов, способные через специфические клеточные рецепторы вызывать острую гипоксию и угнетение метаболизма в радиочувствительных тканях (стимуляторы альфа- и бета-адренергических, аденозиновых, Д-серотониновых, H₁-гистаминовых и ГАМК-эргических рецепторов).

Согласно современным представлениям, радиозащитный эффект связан с возможностью снижения косвенного (обусловленного избыточным накоплением в организме продуктов свободно-радикальных реакций: активных форм кислорода, оксидов азота, продуктов перекисного окисления липидов) поражающего действия ионизирующих излучений на критические структуры клетки – биологические мембраны и ДНК. Основные механизмы реализации радиозащитного эффекта аминокислот связаны с: а) переносом атома водорода из SH-группы аминокислоты к радикалу макромолекулы с последующей ее химической репарацией; б) образованием диаминовых связей между дисульфидными аминокислотами и молекулой ДНК; в) угнетающим влиянием аминокислот на клеточный метаболизм, синтез ДНК и митотическую активность клеток вследствие тканевой гипоксии.

Противолучевое действие второй большой группы радиопротекторов – так называемых радиопротекторов рецепторного действия (агонисты адренергических, серотонинергических и гистаминергических рецепторов), связано с их гипоксическим эффектом, то есть с ограничением доступа кислорода к радиочувствительным органам и тканям и связанным с этим снижением косвенного поражающего действия ионизирующих излучений. Агонисты биологически активных аминов способны через специфические клеточные рецепторы вызывать острую гипоксию и угнетение метаболизма в радиочувствительных тканях (стимуляторы альфа- и бета-адренергических, аденозиновых, Д-серотониновых, H₁-гистаминовых и ГАМК-эргических рецепторов). К числу препаратов, механизм радиозащитного действия которых связан преимущественно с гипоксическим эффектом, относятся биологически активные амины и их фармакологические агонисты (серотонин и другие производные индолилалкиламинов, адреналин, мезатон, клонидин и другие), вызывающие регионарную гипоксию, а также соединения, вызывающие при введении в организм гипоксию смешанного типа (оксид углерода,

метгемоглобинообразователи). Наиболее известные представители этой группы радиопротекторов – мексамин, индралин и нафтизин, цитокины.

Штатный радиопротектор индралин (другое название Б-190), стоящий на вооружении в РФ, относится к альфа-адреномиметикам прямого действия. Б-190 осуществляет радиозащитный эффект, вызывая региональную гипоксию. Препарат в таблетированной форме принимается за 15-20 минут до предполагаемого облучения. Через 30 минут после введения радиозащитный эффект достигает максимума и исчезает через час после применения.

Главным основанием для разделения химических радиопротекторов кратковременного действия на две группы служит различие в химической структуре веществ; другое важное основание – представление о различных механизмах их действия. Схематично можно представить, что радиозащитное действие серосодержащих веществ реализуется в зависимости от достигнутой концентрации их в клетках радиочувствительных тканей, тогда как производные индолилалкиламинов повышают радиорезистентность тканей и всего организма млекопитающего главным образом благодаря развитию гипоксии вследствие сосудосуживающего фармакологического действия серотонина и мексамина. Представление о разных механизмах радиозащитного действия двух типов протекторов привело к смене парадигмы и созданию третьей большой группы радиопротекторов, их комбинации, также предназначенных для однократной и кратковременной защиты от облучения [Patt et al., 1953; Lothe, 1955].

1.1.3. Механизмы радиопротекторного действия

Несмотря на обширные исследования, радиобиологи не достигли единого полного и общепризнанного представления о механизме действия химических радиопротекторов, что отчасти является следствием ограниченности современных знаний о развитии радиационного поражения при поглощении энергии ионизирующего излучения живыми организмами. Имеется несколько основных гипотез механизма действия радиопротекторов кратковременного одномоментного действия.

1) **Индукция гипоксии.** Гипотеза, рассматривающая радиопротекторы как вещества, вызывающие временное снижение концентрации кислорода в ткани. Предполагается, что при этом уменьшается возможность образования окисляющих радикалов и перекисей в процессе облучения. В конечном итоге это должно привести к повышению радиоустойчивости.

2) **Защита биологически активных молекул.** Радиозащитные вещества либо их метаболиты непосредственно вмешиваются в первичные пострадиационные химические реакции. Происходит химическая модификация биологически чувствительных молекул-мишеней путем создания смешанных дисульфидов между SH-группой аминокислоты белковой

молекулы и SH-группой протектора. Гипотеза предполагает, что в результате химических реакций серосодержащие радиопротекторы реагируют с сульфгидрильными группами биологически важных молекул и тем самым «прикрывают» их от действия ионизирующей радиации. Индуцируется передача водорода протектора пораженной молекуле-мишени. Согласно этому представлению, серосодержащие радиопротекторы способны связывать радикалы, образующиеся при радиационном воздействии. Происходит инактивация окислительных радикалов, возникающих преимущественно при взаимодействии ионизирующего излучения с молекулами воды пораженной ткани. Предполагается, что в результате этого процесса окисляющие радикалы не поражают молекулы клеток.

3) Снижение метаболической активности радиочувствительных систем. Сформировано представление о радиопротекторах как о соединениях, повышающих радиоустойчивость биохимических систем. Эти представления объясняют действие радиозащитных веществ их влиянием на клеточный и тканевый метаболизм. Не участвуя в самой защите, они косвенно способствуют созданию состояния повышенной радиорезистентности, мобилизуя собственные резервы организма. При действии радиопротекторов этого класса происходит высвобождение собственных эндогенных, способствующих защите веществ, таких как эндогенные SH-вещества, в особенности восстановленный глутатион или эндогенные амины (например, гистамин). При их действии тормозятся различные радиочувствительные биохимические системы, например, биосинтез ДНК, окислительное фосфорилирование в микроструктурах клеток, образование макроэргических соединений в ядре клетки и т. д. Механизм временного торможения биохимических систем в свою очередь основывается на способности радиопротекторов вступать в химические связи с молекулами ферментов и, в частности, ферментов метаболизма нуклеиновых кислот. Происходит подавление ферментативных процессов при окислительном фосфорилировании, синтезе нуклеиновых кислот, белков и др., ведущих к снижению общего потребления кислорода, а в пролиферативных тканях к отсрочке или торможению деления клеток. Этот эффект объясняется взаимодействием протектора с группами ферментов в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме или с белками клеточных мембран. Он носит также название «биохимический шок». Согласно гипотезе о «биохимическом шоке», различные радиопротекторы однотипно изменяют метаболические процессы, переводя клетки в состояние повышенной устойчивости к действию ионизирующей радиации. Также радиопротекторы, действие которых направлено на снижение метаболической активности радиочувствительных систем, оказывают влияние на центральную нервную систему, систему гипофиз/надпочечники, на сердечно-сосудистую систему с созданием общей или избирательной тканевой гипоксии. Сама по себе гипоксия снижает образование пострадиационных окислительных радикалов и радиотоксинов, восстанавливает тканевый

метаболизм. Затем она может привести к высвобождению эндогенных SH-веществ. Современные представления о защитном действии радиопротекторов в большей степени склоняются в пользу концепции «снижения метаболической активности радиочувствительных систем, вызванной действием радиопротектора» [Dent et al., 2003; Wang et al., 1998; Ward, 1998].

4) Механизм радиозащитного действия **радиопротекторов пролонгированного действия** типа биогенных стимуляторов (например, витамины) связан с постепенным увеличением радиорезистентности организма и повышением активности компенсаторных и восстановительных процессов. Так, например, длительное введение в организм витаминов группы Р уменьшает возможность образования геморрагии у облученных животных. Механизм этого явления обусловлен, в частности, способностью витамина Р подавлять активность гиалуронидаз, комплекса ферментов, вызывающих ферментативный распад гиалуроновой кислоты, одной из функций которой является поддержание пространственной стабильности соединительной ткани [Nair et al., 1999; Nakagawa et al., 1996].

5) В последнее время значительно возрос интерес радиобиологов **к цитокинам** – полипептидам, регулирующим рост, дифференцировку, функциональную активность клеток и их радиорезистентность. Противолучевое действие цитокинов определяется их гемо- и иммуностимулирующей активностью, а также способностью повышать эндогенный фон радиорезистентности. Одна из важных особенностей цитокинов – их способность сохранять повышенную радиорезистентность длительное время, до нескольких суток. Противолучевым действием обладают следующие интерлейкины (ИЛ): лимфокины, монокины, колониестимулирующий фактор, интерфероны. Полагают, что по крайней мере ИЛ-1- β может быть использован для экстренной противолучевой терапевтической помощи при аварийных облучениях человека. Как генно-инженерный адаптоген естественного стимулятора иммуногемопозеза, он удовлетворительно переносится человеком в эффективных дозах и уже применяется в клинике [Neta, Douches and Oppenheim, 1986; Neta, 1988; Neta, 1989; Hanson et al., 1988; Riehl et al., 2000; Walden et al., 1995; Walden et al., 1987]. Радиопротекторное действие ИЛ-1- β сопряжено с активацией ИЛ-8 и терминальной дифференцировкой и активацией нейтрофилов. Активированные нейтрофилы выходят на периферию и индуцируют гипоксию за счет реализации механизма нетоза, формирования нейтрофильных трапов и тромбоза капилляров [Cahilog et al., 2020].

Таким образом, адаптогены могут быть использованы в условиях, сходных с теми, которые наблюдались после радиационной катастрофы на Чернобыльской АЭС, когда сложная радиоэкологическая обстановка сочеталась со значительным психоэмоциональным и психоневротическим воздействием на контингенты радиационного риска и осложнялась действием других неблагоприятных экологических факторов (тяжелые металлы, пестициды,

гербициды), усиливающих эффект радиации. В таких условиях происходят снижение общей резистентности, ослабление иммунитета, повышается вероятность заболеваний.

К этой же категории радиопротекторов можно отнести **лиганды к Tool-like рецепторам (TLR)**. TLR являются патоген-распознающими молекулами, которые локализуются на цитоплазматической мембране или в закисленных эндосомах энтероцитов, моноцитов и антигенпрезентирующих клеток таких как дендритные клетки, макрофаги, натуральные киллерные клетки. Основной функцией этих рецепторов является передача информации антигенпрезентирующим клеткам о присутствии в ближайшем окружении различных патогенов или несвойственных организму молекул. TLR способны распознавать такие лиганды как ДНК, дцРНК, флагеллин, фибриноген и прочие молекулярные структуры, характерные для вирусов, бактерий и грибов. Для человека описано десять TLR, и к каждому из них найдены один и более лигандов. При активации TLR происходит передача сигнала на NF-κB, который активирует палитру генов иммунного ответа.

В работе [Burdelya et al., 2008] описывается радиопротекторный механизм, основанный на активации TLR5 рекомбинантным белком CBLB502, полученным из флагелина *Salmonella enterica*. Активированный TLR5 через адаптерный белок MyD88 стимулирует транскрипционный фактор NF-κB, который активирует экспрессию генов белков ингибиторов апоптоза, белков участвующих в связывании активных форм кислорода и генов цитокинов. Синтез этих факторов приводит к подавлению опосредованного радиацией апоптоза и стимуляции регенеративных процессов, что, в конечном счете спасает организм от воздействия летальных доз радиации. Также радиопротекторные свойства проявляют ряд других TLR [Singh et al., 2015, Chen et al., 2016]. В статье 2017 г. [Kurkjian et al., 2017], при активации TLR2/6, помимо радиопротекторного (выживаемость 80,3% при 9,2 Гр), наблюдался радиотерапевтический эффект (выживаемость 50% при введении препарата через 24 часа и 25% при введении через 48 часов после облучения 9,2 Гр). Следует отметить, что лигандом TLR3 является дцРНК, а адаптерным белком TRIF, который, как и в случае с TLR5, активирует NF-κB. Возможно, что одним из векторов радиопротекторного действия препаратов дцРНК (описываемого в настоящем исследовании) является активация защитных систем клеток миелоидного ряда через взаимодействие с TLR.

В дополнение следует сказать, что химическая защита от лучевого поражения в расширенном понимании этой проблемы может включать также стандартные программы фармакохимического лечения заболеваний, явившихся следствием радиационного воздействия.

б) В последнее десятилетие в связи с опасностями радиоэкологического кризиса особое внимание уделяется поиску путей защиты от действия хронического облучения ионизирующими излучениями низкой интенсивности в природных условиях. Традиционные радиопротекторы с

их кратковременным действием и высокой токсичностью оказались непригодными при хроническом облучении. Как показали исследования, проводившиеся в различных странах, в том числе и в России, для этой цели наиболее целесообразно использовать **биологически активные вещества природного происхождения**. Не обладая высокой противолучевой активностью в условиях острого облучения, эти вещества в отличие от классических радиопротекторов могут применяться при хроническом облучении. Благодаря отсутствию (или низкой) токсичности и хорошей переносимости они могут быть использованы в качестве пищевых добавок, которые повышают общую неспецифическую устойчивость организма, стимулируя защитные, антиокислительные резервы организма. К таким защитным природным веществам относятся адаптогены: фито- и зоопрепараты народной медицины (алкалоиды, полисахариды), смеси биологически активных веществ, зооэффекторы, третоны (стимуляторы кроветворения), эстрогены (соединения пролонгированного системного действия), иммуномодуляторы, мобилизующие общую устойчивость организма к заболеваниям, в том числе вызванным лучевым поражением.

7) И наконец описан **механизм радиопротекторного действия, осуществляемый через блокаду CD47 и его лиганда тромбоспидина-1 (TSP1)**. CD47 – широко представленный поверхностный клеточный рецептор для множества регуляторных белков. Наибольший интерес представляет его взаимодействие с TSP1, определяющее влияние CD47 на клеточный рост, гибель, подвижность, митохондриальные процессы и гомеостаз крови [Frazier et al., 2011, Isenberg et al., 2009]. Известно, что взаимодействие CD47 и TSP1 играет важную роль в реакции на тканевые повреждения и стресс. Клетки, не имеющие на своей поверхности комплекса CD47/TSP1, имеют повышенные регенеративные свойства, связанные с тканевыми повреждениями [Isenberg, 2007]. Исследования [Soto-Panja et al., 2013] показали, что блокировка CD47 и (или) TSP1 антителами, CD47 связывающим пептидом или супрессия антисмысловой РНК, предотвращает образование комплекса CD47/TSP1 и защищает клетки желудочно-кишечного тракта и гемопоэтические клетки от летальных доз ионизирующего излучения. Было показано, что после облучения у мышей с заблокированным CD47/TSP1 комплексом падает экспрессия p62, что указывает на активацию аутофагии. Предполагается, что сокращение клеточных органелл в цитоплазме вследствие развивающейся аутофагии приводит к снижению количества субстратов, источников вторичных радикалов, вследствие чего снижается чувствительность клеток к поражению.

1.2. Действие ионизирующего излучения на ядерную ДНК, как особый фактор индукции гибели эукариотической клетки. Репарация двуцепочечных разрывов

Как было сказано ранее, наиболее губительное воздействие ионизирующее излучение оказывает на молекулу ДНК. Повреждения хромосом, следующий за этим aberrантный митоз и гибель клетки, являются еще одним механизмом циторедуцирующего действия ионизирующего излучения. При воздействии потока ионизирующих частиц на ДНК возникают все возможные из описанных в литературе повреждений этих молекул. Наиболее фатальными являются ДЦР. Если в клетке нарушены системы репарации таких повреждений, то клетка запускает механизмы самоуничтожения. Даже если системы репарации в облученной клетке работают нормально, при большом количестве разрывов возникает ситуация хаотичного, не корректного восстановления двуцепочечных концов, что приводит к нарушению функционального хромосомного континуума и инициации апоптоза, происходящего вследствие aberrантного митоза. Описано два основных механизма репарации ДЦР – гомологичная рекомбинация и NHEJ. Ниже приводится концептуальная схема и молекулярные особенности наиболее важных участников репаративного процесса по механизму NHEJ и гомологичной рекомбинации (**Рисунок 1**).

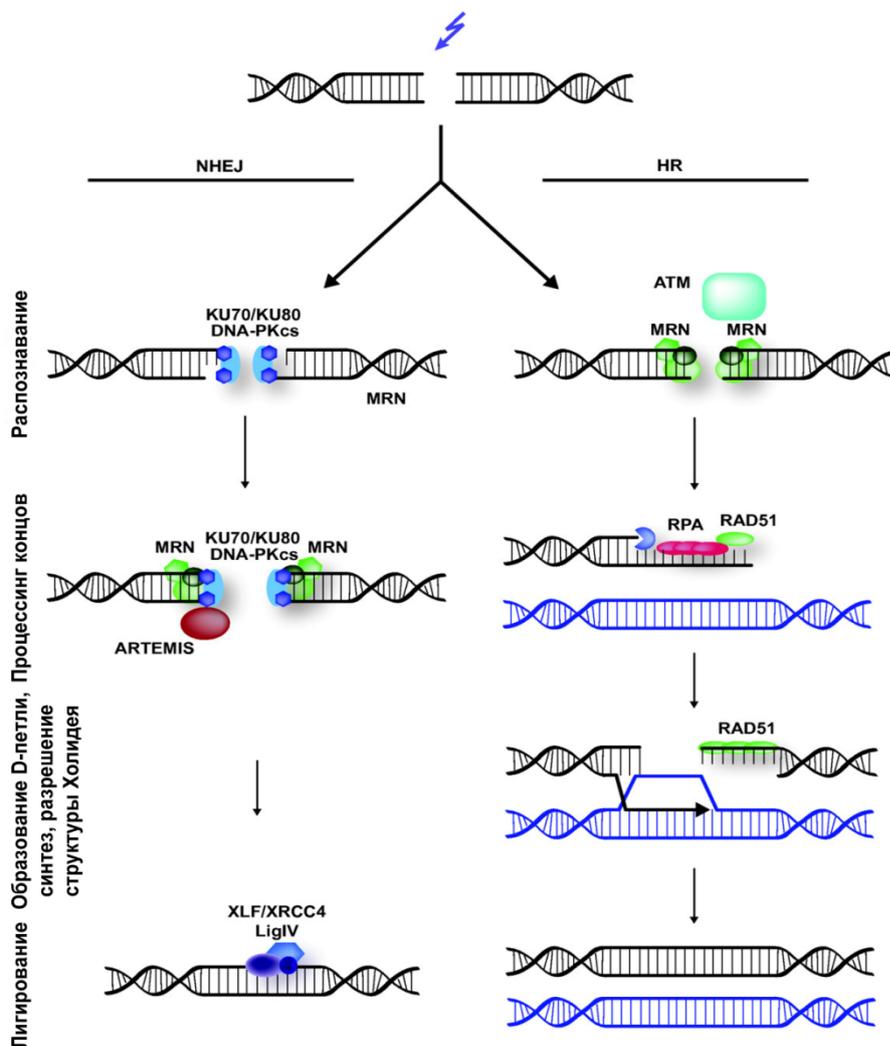


Рис. 1. Модели репарации по пути NHEJ и гомологичной рекомбинации (HR) [Lans, Marteiijn and Vermeulen, 2012].

NHEJ играет большую роль при репарации ДЦР в клетках, находящихся в стадии G₀/G₁, и ранней S фазы клеточного цикла. Механизм репарации следующий. Концы ДЦР узнаются гетеродимерным комплексом Ku70/Ku80. Этот комплекс связывается с ДНК в месте разрыва и образует комплекс с каталитической субъединицей ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), образуя полную ДНК-зависимую протеинкиназу, DNA-PK. Образовавшийся белковый мостик обладает киназной активностью. Фосфорилируя факторы Artemis, WRN, MRN, а также hTDP1, MDC1, TP53BP1 и некоторые другие кофакторы, DNA-PK запускает процессинг порванных концов. Далее к комплексу Ku притягивается ДНК лигаза IV, а XRCC4 ассоциирует с DNA-PK. Такое образование способствует стабильной ассоциации XRCC4 и ДНК лигазы IV (X4L4) с комплексом DNA-PK на сформированных интермедиатах репарации – одноцепочечных концах. Комплекс лигирует концы и завершает репарацию. Далее приведены некоторые свойства и функции факторов Artemis, WRN и MRN.

Artemis – белок, обладающий нуклеазной активностью. В репаративном процессе в комплексе с DNA-PK ответственен за процессинг 5' и 3' концов. Artemis расщепляет длинные одноцепочечные концы в 4-5 нуклеотидах, а короткие в 2 нуклеотидах от места их перехода в двойную спираль [Povirk et al., 2007].

MRN комплекс состоит из Mre11, Rad50 и Nbs1 белков. Активность Mre11 напрямую зависит от Rad50 АТФазы. При возникновении ДЦР активированная АТМ киназа фосфорилирует Mre11 и таким образом активирует нуклеазную активность фактора.

Nbs1 отвечает за прочную посадку всего комплекса вблизи ДЦР. Два посадочных белка H2AX и Rad17 фосфорилируются АТМ и формируют структуру хроматина, необходимую для посадки репаративных комплексов в сайт разрыва.

ДНК геликаза WRN – проявляет 3'→5' геликазную и 3'→5' экзонуклеазную активность. Комплекс задействован практически во всех молекулярных процессах, связанных с активностью хроматина, включая репарацию, рекомбинацию и транскрипцию.

В процессе NHEJ гетеродимер Ku и ассоциированный с ним фермент-коферментный комплекс X4L4 активирует экзонуклеазный домен WRN, рекрутированного в сайт репарации [Menon and Povirk, 2016].

Гомологичная рекомбинация более предпочтительный путь репарации ДЦР в клетках, находящихся в поздней S и G₂ фазе клеточного цикла. Имея множество вариаций, у млекопитающих выделяют два основных пути: модель двойной структуры Холлидея и путь синтез-зависимого отжига цепей. Эти пути отличаются лишь разрешением D-петли.

MRN комплекс связывается с хроматином по обе стороны ДЦР и образует связующую разорванные концы «площадку» для посадки последующих белков репаративного комплекса.

Далее в два этапа происходит процессирование 5'-концов. На первом этапе нуклеаза Sae2 расщепляет 5'-концы вблизи разрыва. Далее геликаза Sgs1 продолжает плавить цепь, а Eho1 и Dna2 расщепляют ДНК в 5'-3' направлении. «Голые» 3'-концы покрываются RAD51 и RPA, который защищает их от нуклеаз и не дает им схлопнуться. Сформированная нуклеопротеидная нить образует D-петлю с гомологичными участками сестринских хроматид, либо гомологичных хромосом. При этом RAD52 помогает RAD51 образовывать промежуточные комплексы с гомологичными нитями, образуя гептамерное кольцо и «надеваясь» на целевую ДНК. RAD54 влияет на топологическую структуру ДНК вблизи ДЦР, препятствуя суперскручиванию и облегчая доступ к нему репаративных белков. После образования D-петли, полимераза достраивает внедрившийся 3'-конец по матрице с гомологичного участка. Второй 3'-конец достраивается либо по матрице вытесненной нити ДНК, и тогда получившаяся структура Холлидея разрешается по кроссоверному пути или по пути генной конверсии, либо по матрице уже отстроенного 3'-конца, после того как она выпрямилась и покинула D-петлю [Helleday et al., 2007].

Существует третий механизм репарации ДЦР, представляющий интерес в рамках литературного обзора. **Микрогомологичное соединение концов** преимущественно активно в S фазе и по механизму напоминает гомологичную рекомбинацию по типу однострессового отжига (single-strand annealing). В отличие от этого типа репарации, микрогомологичное соединение концов не зависит от активности RAD52 и работает с гомологичными участками длиной в 5-25 п.н. (однострессовый отжиг нуждается в гомологичных участках >30 п.н.). Также известно, что микрогомологичное соединение концов не нуждается в белковом комплексе Ku, каталитическом комплексе DNA-PK и DNA ligase IV, что отличает её от NHEJ.

Модель микрогомологичного соединения концов. На начальных этапах Ku70-Ku80 и Rad51 связываются с двуцепочечными концами, препятствуя их нуклеазной деградации. Далее, факторы кэпирования диссоциируют, и при участии комплекса MRX, Sae2 и Eho1 осуществляется процессинг 5'-конца. Это открывает доступ к участкам «микрогомологий». «Микрогомологии» благодаря динамическим колебаниям временно аннигилируют друг с другом. В случаях стабильного отжига репарация завершается резекцией свисающих концов, достройкой цепи и лигированием. Такой путь приводит к делециям. В качестве альтернативы одна или несколько транс-ошибочных полимераз могут осуществлять частичный синтез, используя в качестве затравки не гомологичный короткий участок ДНК, проксимальный к «микрогомологии». Происходит диссоциация исходных «микрогомологий» и перегруппировка в другие микрогомологичные спаривания. Удаление свисающих концов, достройка гомологичной цепи и лигирование завершают восстановление целостности ДНК. Этот механизм приводит к появлению различных вариантов делеций и инсерций. Результатом указанных процессов

являются разнообразные нарушения последовательности ДНК в сайте воссоединенных двуцепочечных концов (**Рисунок 2**).

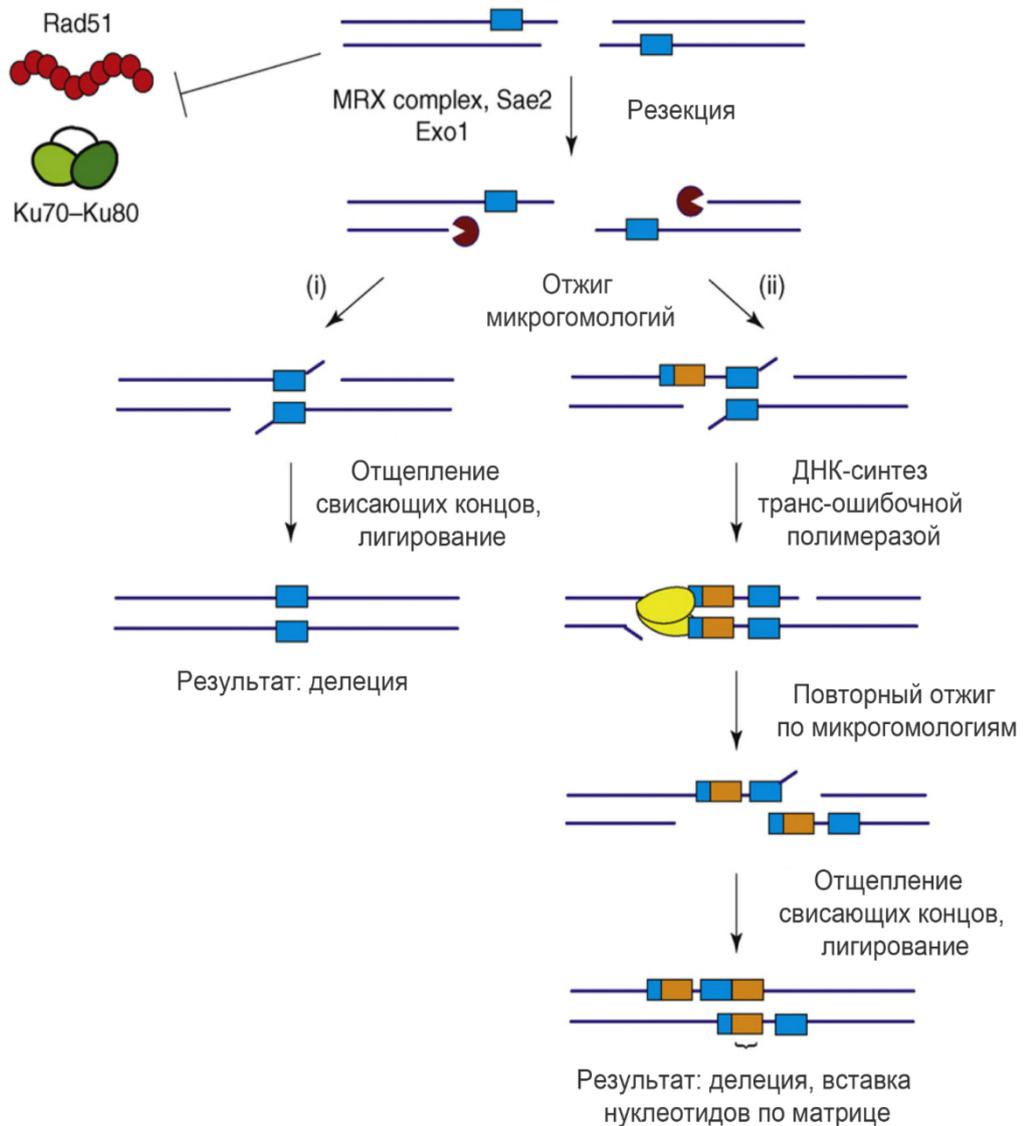


Рис. 2. Гипотетический механизм репарации по типу микрогомологического соединения концов. Ku70-Ku80 (обозначено зеленым цветом), Rad51 (обозначено красным цветом), MRX, Sae2 и Exo1 (обозначено темным красным частичным кругом), участки «микрогомологий» (синие прямоугольники), транс-ошибочная полимераза (обозначено желтым цветом), отожденные последовательности (оранжево-синие прямоугольники) [Mcvey and Lee, 2008].

1.2.1. Выбор пути репарации

При возникновении ДЦР в клетке возникает рекомбиногенная ситуация, требующая выбора пути репарации. Считается, что если ДЦР возникает в результате остановки репликативной вилки (одинарный двуцепочечный конец), то предпочтительным является путь гомологичной рекомбинации.

На выбор пути репарации ДЦР, индуцированных ионизирующим излучением, влияет несколько факторов. Во-первых, это фаза клеточного цикла, во-вторых, полученная доза, от которой зависит количество индуцированных ДЦР на клетку. Известно, что путь NHEJ активен

как в G_1 , так и в S/G_2 фазах клеточного цикла. Гомологичная рекомбинация, в виду молекулярных особенностей репаративного механизма, не может происходить без гомологичной матрицы. Репарации по этому механизму проходят лишь в S /ранняя G_2 фазах клеточного цикла [Shibata, 2017]. Эксперименты на клетках млекопитающих (яйцеклетки китайского хомяка), свидетельствуют, что в разные фазы клеточного цикла NHEJ и гомологичной рекомбинации вносят различный вклад в выживаемость. Так клетки с дефектом работы системы гомологичной рекомбинации более чувствительны к ионизирующему излучению в поздней S/G_2 фазах и умеренно чувствительны в фазе G_1 . Клетки, дефективные по NHEJ, в свою очередь, имеют повышенную чувствительность во всех фазах клеточного цикла, но при этом менее чувствительны в S/G_2 , чем в G_1 . Репарация по пути NHEJ протекает без использования гомологичного шаблона, что приводит к хромосомным aberrациям – делециям, транслокациям. Использование клеткой сразу двух механизмов репарации в S/G_2 фазах клеточного цикла объясняется следующими соображениями. При больших дозах ионизирующего излучения, влекущих за собой появление >600 ДЦР на клетку, система гомологичной рекомбинации достигает предела насыщения, вследствие чего остаточное количество ДЦР восстанавливается путем NHEJ [Rothkamm et al., 2003]. В других случаях реализуется преимущественно репарация, идущая по механизму гомологической рекомбинации.

Как видно из проведенного анализа, пути репарации NHEJ и гомологичной рекомбинации пересекаются и в определенных условиях взаимозаменяемы. На это указывает также тот факт, что оба пути начинаются с присоединения к концам ДЦР белков Ku и каталитического комплекса DNA-РК. Предположительно это необходимо для защиты возникших двуцепочечных концов от действия клеточных нуклеаз в первые секунды возникновения повреждения. После этого, в зависимости от выбранного пути репарации процесс продолжается по пути NHEJ, либо связавшиеся сар-белки удаляются белком Mre11, после чего запускается репарация по пути гомологичной рекомбинации.

1.3. Характеристика инициирующих репаративный процесс событий

В клетке существует несколько общеклеточных факторов, определяющих появление повреждения (такого, как ДЦР или одноцепочечная ДНК) и сигнализирующих о нем клетке. Активация иерархических киназ ATM, ATR, ДНК-РК, относящихся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназависимых киназ (PIKK), индуцирует каскад событий, являющихся ответом клетки на ДЦР, остановку репликативной вилки или общее изменение структуры хроматина высшего порядка, то есть на стрессы, связанные с грубыми нарушениями структуры хроматина, которые требуют обязательного внимания клетки и репарации. Три типа

трансдуцирующих киназ ATM, ATR, ДНК-РК взаимозаменяемы, но проявляют большую специфичность при различных типах повреждений.

В ответ на возникшие ДЦР в первую очередь активируется ATM, которая затем фосфорилирует свои субстраты – киназы, в их числе ДНК-PrK, участвующую в репарации ДЦР, а также факторы, ответственные за арест клеточного цикла. Chk1, Chk2, P53.

Индукция остановки клеточного цикла определяется **фосфорилированием Chk1 и Chk2**, которые в свою очередь гиперфосфорилируют CDC25 фосфатазу и таким образом инактивируют её. В норме CDC25, дефосфорилирует циклин/циклинзависимый протеинкиназный комплекс (CDK), поддерживая его рабочее состояние. При гиперфосфорилировании CDK ингибируется перенос CDC45 к Ori ДНК репликации [Sørensen et al., 2003]. Таким образом CDC25 регулирует прогрессию клеточного цикла через активирование CDK, которая, помимо активации Rb/E2F комплекса, принимает участие в активации гексамера MCM2-7 (ДНК геликазы), который входит в пререпликативный комплекс и катализирует плавление цепей в процессе репликации.

P53-метаболический путь ареста клеточного цикла связан с транскрипцией гена p21 Waf1/Cip1, которая запускается активированным онкосупрессором, и белковый продукт которого связывает и ингибирует комплексы циклин/CDK. В результате нефосфорилированный Rb удерживает E2F, и цикл деления останавливается [Bakkenist et al., 2015].

Таким образом, ответом на повреждение ДНК в виде ДЦР, вызванного ионизирующим излучением, является активация ATM и следующий за этим событием каскад фосфорилирования, в итоге приводящий к аресту клеточного цикла.

Наименее понятным этапом является момент инициации репаративного процесса, приводящего к активации ATM. Анализ литературы свидетельствует, что ATM может активироваться сразу с нескольких иницирующих векторов различных клеточных функциональных систем. Однако, как предполагается, основным иницирующим фактором является изменение, так или иначе, структуры хроматина высшего порядка. Это или ДЦР, или деконденсация хроматина, вызванная любым из описанных в литературе факторов. В результате нарушения структуры хроматина высшего порядка (конденсированного) происходит активация ATM. ATM может автофосфорилироваться, может ацетилироваться KAT5 с последующим автофосфорилированием. ATM может фосфорилироваться ATR при первичной активации ATR в результате «сталлирования» репликативной вилки и формирования одноцепочечных участков.

Приведем несколько охарактеризованных механизмов активации ATM.

Анализ кинетики фосфорилирования ATM свидетельствует, что ATM может быть активирована **нарушением структуры хроматина высшего порядка**. Экспозиция клеток с различными, не нарушающим целостность молекулы ДНК, агентами, таким как гипотония, хлороквин, ингибитор гистоновой ацетилазы тихостатин (TSA) приводит к пертурбации

хроматина без появления ДЦР. При этом происходит кинирование серина-1981 АТМ, что сопровождается активацией киназы. При таких обработках не детектируется H2AX фосфорилирование. Кроме того, активация АТМ в этом случае не требует присутствия MRN комплекса. Иммуноокрашивание фосфорилированного белка свидетельствует о диффузном распределении АТМ в ядерном пространстве. Предполагается, что деконденсация хроматина является «разрешительным событием» для КАТ5 связывания с H3K9me3 и H3K36me3, с-Abl зависимом КАТ5 фосфорилировании по тирозину-44 и следующим за этим каскадом активирующих событий [Bakkenist et al., 2015].

КАТ5 является одним из известных агентов, инициирующих репаративный процесс ДЦР. Известно, что после возникновения разрывов ДНК происходит КАТ5 (ортолог Tip60) зависимое ацетилирование АТМ. Немедленно после возникновения разрыва в сайте повреждения происходит пертурбация и разрыхление хроматина, вытеснение гистонов. Изменение компактизации хроматина позволяет КАТ5 связаться с гистонами H3K9me3 и (или) H3K36me3, которые функционируют как аллостерические активаторы, индуцирующие КАТ5 ацетилирование АТМ по лизину-3016. Связывание КАТ5 с H3K9me3 происходит в комплексе с АТМ. Это событие приводит к фосфорилированию КАТ5 по тирозину-44 с-Abl тирозин киназой и активации его ацетилирующего домена. КАТ5 ацетилюет АТМ. Происходит распад неактивного димера фермента на мономеры и автофосфорилирование АТМ. Далее, АТМ, активированная в ответ на возникшее повреждение (ДЦР), активирует p53, Chk1, Chk2, что приводит к аресту клеточного цикла, опосредованному вышеописанным каскадным фосфорилированием разных эффекторных молекул. с-Abl тирозин киназа представляет собой убиквитилированно экспрессирующуюся киназу, присутствующую как в цитоплазме, так и в ядре. По-видимому, физическое взаимодействие комплекса КАТ5-АТМ с H3K9me3 инициирует рекрутирование в сайт связывания с-Abl тирозин киназы, которая распространена повсеместно в ядерном пространстве, что приводит к фосфорилированию и активации ацетилазы. Ассоциация КАТ5 с H3K9me3, который находится в инактивированном хроматине, с H3K36me3, который находится в активном хроматине, и деконденсация хроматина во фланкирующем ДЦР районе являются центральными молекулярными механизмами активации АТМ [Kaidi and Jackson, 2013; Meltser et al., 2011; Mahajan, 2015; Bakkenist et al., 2015].

Важным моментом активации АТМ является ее молекулярные взаимоотношения с другой иерархической киназой – АТР. АТМ-зависимая протеин киназа АТР активируется при возникновении одноцепочечных участков ДНК, возникающих при формировании ДЦР, остановке репликативной вилки и при других нарушениях в структуре хроматина, приводящих к появлению неспаренных участков ДНК. При возникновении одноцепочечных участков, последние немедленно покрываются репликативным фактором А (RPA). При участии

нескольких кофакторов (RAD17-RFC2-5, RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1), ATR-ATRIP, TOPBP1) происходит активации ATR и развитие репаративного ответа. ATM и ATR имеют различную субстратную специфичность и могут взаимодействовать друг с другом. Обе киназы влияют на рекрутирование друг друга в сайт повреждения. При этом ATM создает условия для активации ATR в результате процессинга двуцепочечных концов. С другой стороны, ATR может фосфорилировать H2AX в ответ на остановку репликативной вилки, что привлекает в сайт стабильности ATM. Обе киназы также могут напрямую фосфорилировать друг друга в ответ на репликативный стресс. И ATM, и ATR могут влиять на локализацию и функционирование своих регуляторов. Такие отношения двух иерархических киназ предполагают, что при любом изменении структуры хроматина высшего порядка и возникновении специфических интермедиатов, появление которых в обязательном порядке должно активировать одну из киназ, будет активирован арест клеточного цикла и индуцированы механизмы репарации нарушенной структуры хроматина высшего порядка [Maréchal and Zou, 2013].

И наконец, охарактеризованы некоторые другие клеточные процессы, приводящие к модуляции структуры хроматина высшего порядка и активации ATM. К таким процессам относятся инсулиновый шок, ингибирование цепи передачи электрона в митохондриях, гипоксия и другие метаболические стрессы.

Гипоксия является одним из наиболее физиологически значимых стрессов, при которой активируется и ATR, и ATM в отсутствие детектируемых повреждений ДНК. Известно, что активация ATR при гипоксии связана с остановкой репликативной вилки и накоплением одноцепочечных участков ДНК. Также известно, что обе киназы активируют друг друга и, таким образом, активация ATM при гипоксии в первую очередь связана с активностью ATR. В случае физиологических стрессов (гипоксия) автофосфорилирование ATM не зависит от MRN комплекса, тем не менее, медиатор MDC1 значительно усиливает гипоксия-индуцированную ATM активность. При такого рода индукции ATM, находящаяся в ядре, не формирует каких-либо фокусов и плотно не ассоциирована с хроматином.

Существуют данные, что в отличие от гипоксии, репликативный стресс, вызванный **ультрафиолетовым облучением**, не приводит к активации ATM. Тем не менее, установлено, что длительная экспозиция ультрафиолетом активирует ATM. Данное явление предполагает, что существует добавочный сигнал, активирующий ATM. Таким сигналом, по-видимому, являются ДЦР, транзитно возникающие при коллапсе репликативной вилки и не детектируемые специфическими антителами [Olcina et al., 2014].

Проведенный анализ свидетельствует о наличии комплексного ответа клетки на повреждения и различные изменения структуры хроматина высшего порядка, при котором

активируется система иерархических киназ, и индуцируются молекулярные системы или восстановления целостности хроматина, или нормализации его пространственной организации.

1.4. Интернализация нуклеиновых кислот в эукариотическую клетку. Механизмы, факторы

Основным лейтмотивом настоящей работы является представление об участии экстраклеточных фрагментов нуклеиновых кислот в репаративных процессах, протекающих в клетке после воздействия жесткого излучения. Такое участие возможно только в случае появления таких экстраклеточных нуклеиновых кислот во внутренних компартментах клетки. В данном разделе будут приведены данные об интернализации нуклеиновых кислот и, главным образом, фрагментов дцДНК во внутриклеточные компартменты, находящиеся в свободном доступе. Такой неполный анализ связан с тем, что в доступных литературных источниках имеется крайне ограниченная информация об интернализации в эукариотическую клетку молекул РНК и, в частности, молекул дцРНК. Также в настоящем разделе не будут затронуты аспекты исследований, выполненных в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН, в которых впервые описан новый общебиологический феномен – способность низкодифференцированных клеток различного генеза, включая стволовые клетки и стволовые иницирующие раковые клетки, интернализировать естественным механизмом фрагменты экстраклеточной дцДНК [Ritter et al., 2022].

Первым этапом взаимодействия экстраклеточной ДНК и клетки является контакт и преодоление экстраклеточной нуклеиновой кислотой цитоплазматической мембраны. Считается, что поскольку в мембране эукариотической клетки содержится большое количество фосфатидилсерина, гликолипидов и гликопротеинов, поверхность клеток эукариот имеет общий отрицательный заряд. Вследствие этого при сближении ДНК, имеющей отрицательно заряженный сахарофосфатный остов с клеточной поверхностью, происходит электростатическое отталкивание, что не способствует связыванию ДНК с клеткой. Тем не менее, в последнем десятилетии было проведено множество исследований, доказывающих высокую эффективность проникновения ДНК в клетку в отсутствие каких-либо трансфецирующих агентов.

Одним из простейших способов попадания ДНК внутрь клетки является фагоцитоз апоптозных телец, содержащих фрагменты ДНК [Savill et al., 1993; Lawen, 2003]. Такой метод захвата экстраклеточных нуклеиновых кислот осуществляют различные клетки, такие как фибробласты человека, макрофаги, эндотелиальные клетки аорты быка, дендритные клетки, эндотелиальные клетки печени, моноциты человека, клетки сосудов гладкой мускулатуры [Garcia-Olmo et al., 2004; Holmgren et al., 1999; Lawen, 2003]. Интернализация по этому механизму

проходит достаточно стремительно. Так при совместном культивировании апоптозирующих и реципиентных клеток достаточно одного часа для утилизации деградированного клеточного материала.

Большая часть авторов указывают на то, экстраклеточная ДНК в клетку попадает именно по пути эндоцитоза. Эндоцитоз – это способ поглощения клеткой объектов окружающей среды путем адсорбции их на мембране с последующим ее впячиванием и образованием везикул, в которых поглощенные объекты впоследствии перевариваются. Как предполагаемый механизм захвата экстраклеточной ДНК разными исследовательскими группами назывались практически все известные типы эндоцитоза [Amyere et al., 2001; Khalil et al., 2006].

Эффективность этих процессов определяется степенью связывания поглощаемых молекул с поверхностью клетки, что, в свою очередь, зависит от эффективности их взаимодействия с компонентами клеточной мембраны (адсорбционный эндоцитоз) либо от аффинности по отношению к соответствующим клеточным рецепторам, а также представленности этих рецепторов на цитоплазматической мембране клетки (рецептор-опосредованный эндоцитоз). В процессе исследования было обнаружено несколько различных механизмов проникновения нуклеиновых кислот в клетки. Помимо адсорбционного эндоцитоза, было показано вовлечение фагоцитоза и макропиноцитоза, обеспечивающих интернализацию в клетки молекул размером до 2 нм [Gottlieb et al., 1993]. Вероятно, при высоких концентрациях ДНК в среде, когда происходит насыщение мембранных рецепторов, макропиноцитоз может быть преобладающим механизмом.

При небольших концентрациях ДНК во внеклеточном пространстве эндоцитоз может протекать в результате взаимодействия с белками, расположенными в мембране клетки. Было выделено и описано большое количество клеточных белков, с разной специфичностью и эффективностью связывающих олигонуклеотиды и протяженные молекулы ДНК [Diesbach et al., 2000; Herz and Strickland, 2001; Челобанов и др., 2006]. Молекулярная масса выделенных белков варьировала от 15 до 147 кДа [Челобанов и др., 2006]. Выявленные в этих работах белки обладают различным сродством к поли-, олиго- и мононуклеотидам. Были получены экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу того, что транспорт молекул ДНК в лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и клетки скелетных мышц происходит путем взаимодействия ДНК с белками, расположенными на клеточной поверхности [Hefeneider et al., 1990; Bennett et al., 1993; Schubbert et al., 1997].

Однако большинство из описываемых в литературе ДНК-связывающих белков, обнаруженных на поверхности различных культивируемых клеток, не были окончательно охарактеризованы, и их роль в процессе поглощения клетками ДНК остается неясной. Также было показано, что небольшие молекулы нуклеиновых кислот могут проходить через мембрану

клеток благодаря наличию в ней специальных белковых каналов [Hanss et al., 1998; Leal-Pinto et al., 2005; Shi et al., 2017] или с помощью прохождения через локальные отверстия в клеточной мембране [Budker et al., 2000].

Во многих работах было показано проникновение экстраклеточной ДНК не только в цитоплазму, но и в ядро с последующим проявлением биологической активности и возможной экспрессией переносимых генов (в случае плазмидных конструкций) [Anker et al., 1980; Bergsmedh et al., 2002; Filaci et al., 2004; Holmgren et al., 1999]. Для проникновения в ядро клетки чужеродной ДНК ей необходимо преодолеть ядерную оболочку – естественный барьер, отделяющий геномную ДНК клетки. Ядерная оболочка состоит из внутренней и наружной мембран, ядерных поровых комплексов и ламины, представляющей собой сетчатую структуру, расположенную между внутренней мембраной и хроматином. ДНК, находящаяся в непосредственной близости от ядерной оболочки, может попасть внутрь ядра либо в процессе деления клетки, когда ядерная оболочка разрушается и вновь конструируется, захватывая чужеродную ДНК, либо специфично импортироваться в ядро через ядерный поровый комплекс [Crisp et al., 2005; Ondrej et al., 2008]. Предполагается, что ламина, а также актин, присутствующий как в ядре, так и в цитоплазме клетки, участвуют в процессах доставки ДНК в непосредственную близость к ядру и проникновения во внутриядерное пространство. Было показано, что движение пришедшей в ядро ДНК разных размеров в большой степени ограничено, по сравнению с движением ДНК в цитоплазме. Предполагается, что при попадании в ядро ДНК находится в связанном состоянии с некоторыми внутриядерными структурами (ядерным матриксом). Это определяет нахождение ДНК в строго определенном районе ядра. Также было показано, что районы, в которых присутствуют естественные или индуцированные ДЦР, являются предпочтительными для локализации экстраклеточной ДНК. Индуцированные ДЦР в целевом гене эффективно повышает частоту интеграции чужеродной ДНК в этот сайт [Ondrej et al., 2008].

Лок и Замечник с соавторами [Loke et al., 1989; Zamesnik et al., 1994] в своих работах показали возможность транспорта коротких олигонуклеотидов в ядро реципиентной клетки. В экспериментах использовали культуры человеческих клеток HeLa, лимфомы Буркитта, лимфобластной лейкемии Т-клеток, линию мышинных миелоидных клеток и фибробласты зародыша цыпленка. Оказалось, что олигонуклеотиды достигают ядра в течение нескольких минут. Через 60 мин олигонуклеотиды концентрируются в ядре реципиентной клетки.

Предполагается, что размер ДНК является критическим фактором, влияющим на процесс проникновения ДНК в ядро клетки. Структура ядерной поры налагает строгое ограничение на размер проникающих частиц: внешний канал ядерной поры составляет 9-10 нм в диаметре. Показано, что ДНК размером до 300 п.н. свободно проникает в ядро путем пассивной диффузии.

Не покрытая белками такая линейная ДНК, имеет размеры около 70 нм в длину и 2 нм в диаметре и, так как она не формирует глобулярную структуру, то легко проходит сквозь узкий канал ядерной поры [Ludtke et al., 1999; Munkonge et al., 2003]. Для более протяженных молекул ДНК появляются стерические затруднения, препятствующие свободному проникновению молекул в ядро клетки. Доставка протяженной ДНК в ядро представляет собой энергозатратный процесс. При этом необходимо наличие сигнала ядерной локализации, представляющего собой положительно заряженный олигопептид, содержащий несколько остатков лизина и аргинина [Crisp et al., 2005]. Считается, что после выхода из эндосомального компартмента ДНК появляется в виде свободной молекулы в цитозоле, где, в зависимости от размеров молекулы, ДНК может либо свободно проникнуть в ядро, либо остаться в цитоплазме, если ее размер больше, чем 1 т.п.н. В последнем случае высока вероятность деградации ДНК клеточными нуклеазами. Связывание ДНК с белками, содержащими сигналы ядерной локализации, значительно повышает эффективность доставки ДНК в ядро, которая возрастает больше чем на 80% [Zanta, Belguise-Valladier and Behr, 1999]. ДНК, связанная с ядерными белками, транскрипционными факторами, гистонами, НМГ (high mobility group) белками, эффективно проникает в ядро. При этом наблюдается дозозависимый эффект: как минимум 3-4 сигнала ядерной локализации должны приходиться на 100 п.н. ДНК. При повышении количества сигналов ядерной локализации эффективность доставки соответственно возрастает. Связывание ДНК с сигналом ядерной локализации в настоящее время представляет собой один из перспективных методов трансфекции.

В работе [Rogachev et al., 2006] на культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 был проведен количественный анализ и анализ качественных признаков ДНК, транспортируемой во внутриклеточное пространство. Экзогенная ДНК (фрагменты размером 1.4 и 11 т.п.н.) через очень короткий промежуток времени (менее минуты) обнаруживалась в цитоплазме и ядерном пространстве в недеградированном, исходном виде. Показано, что фрагмент размером 11 т.п.н. немедленно доставляется в ядро клетки, без видимого присутствия в цитоплазме. Напротив, фрагмент размером 1.4 т.п.н. распределяется равномерно в цитоплазматической и ядерной фракции.

Как следует из проведенного краткого анализа литературы, экстраклеточная ДНК в различной форме способна достигать внутренних компартментов реципиентной клетки, где возможно ее включение в различные процессы клеточного метаболизма. Процессы утилизации экстраклеточной ДНК в большей степени гипотетичны. Одним из путей утилизации экзогенной ДНК, захваченной из окружающей среды помимо деградации, может быть использование клеткой протяженных фрагментов как эписомальных структур в качестве субстрата репаративно-рекомбиногенного процесса. Такая возможность подтверждена экспериментами, выполненными

в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН, где показано, что линейаризованная плазмидная ДНК в столовых клетках костного мозга мышей подвергается краевому нуклеазному гидролизу с последующей циклизацией плазмиды. Установлено, что до 1000 п.н. может быть «отъедено» со свободных двуцепочечных концов линейаризованной плазмидной ДНК [Dolgova et al., 2013].

Для молекул РНК описаны механизмы интернализации в составе экзосом или в ассоциации с транспортными пептидами [Rashed et al., 2017; Kauffman et al., 2015]. Показано, что открытый недавно RAGE рецептор способен связывать и интернализировать в клетку кроме двуцепочечной ДНК также и молекулы РНК. При этом связывание и интернализация РНК не зависит от последовательности полимера [Bertheloot et al., 2016].

1.5. Участие экстраклеточных нуклеиновых кислот в репаративных процессах, протекающих в эукариотической клетке

Процессы репарации ДНК различны, многофакторны и, по-видимому, могут дополнять друг друга. Как было сказано выше, существуют два основных пути репарации — NHEJ и гомологичная рекомбинация. При репарации по механизму гомологичной рекомбинации обязательно присутствует матрица, по которой или с которой осуществляются гомологичные взаимодействия молекул нуклеиновых кислот. И в этой связи одним из интригующих вопросов процесса репарации различного генеза является возможность участия в репаративных событиях ДНК или РНК молекул, и в особенности экстраклеточных фрагментов ДНК или РНК, интернализированных в клетку.

Гомологичная рекомбинация, реализующаяся **по механизму спаривания одноцепочечного участка, сопряженного с синтезом ДНК**, является одним из основных механизмов репарации ДЦР в клетке, находящейся в поздней S и G2 фазе клеточного цикла **(Рисунок 3)**.

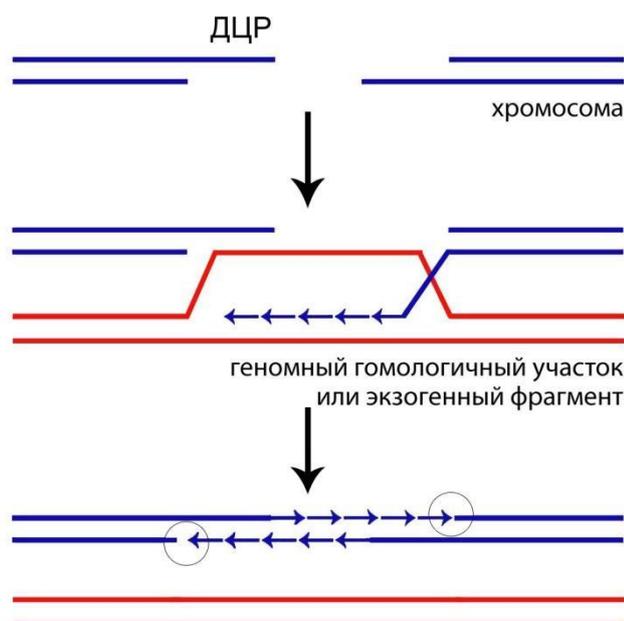


Рис. 3. Гомологичное спаривание с последующим синтезом ДНК. Филамент процессированного 5'-конца разорванного дуплекса спаривается с гомологичной областью экзогенного фрагмента. Минимальный участок, необходимый для спаривания при этом механизме гомологичного обмена, составляет 30–100 п.н. После синтеза по экзогенной матрице, новая цепь высвобождается из D-петли и находит свою гомологию на противоположном конце разрыва. После достраивания второй цепи одноцепочечные нити лигируются и целостность дуплекса восстанавливается [Rubnitz, 1984; Szostak et al., 1983].

Репарация ДЦР, сопряженная с гомологичной рекомбинацией этого типа, начинается с обнаружения концов разорванного дуплекса специфическим комплексом MRE11, который удерживает вместе оба конца разорванной молекулы и процессирует концы, делая их доступными для ассоциации с репликативным белком A (RPA) и белками RAD-семейства. Сформированные в результате действия MRE11 комплекса и экзонуклеазы одноцепочечные хвосты на концах поврежденного дуплекса покрываются RPA, который удаляет вторичные структуры на этих участках. RAD52 направляет RAD51 к покрытым RPA одноцепочечным участкам, что приводит к замещению RPA на RAD51 и формированию RAD51 нуклеопротеиновых филаментов. RAD54 осуществляет поиск гомологичных RAD51 филаменту последовательностей по всему геному, опосредует инвазию, спаривание цепей и формирование D-петли. Именно в этой части процесса экстраклеточные ДНК фрагменты могут в качестве внешней гомологичной матрицы использоваться клеткой для осуществления репарации ДЦР. После формирования D-петли происходит синтез ДНК на матрице. Гомология нуклеотидов, требующаяся для такого спаривания, не превышает 30–100 п.н. Поврежденная цепь с вновь синтезированным участком освобождается и спаривается с участком ДНК противоположного конца разорванного дуплекса. После достройки цепи в месте одноцепочечного участка и лигирования репарация завершается, при этом донорская матрица остается интактной [Szostak et al., 1983].

Показано, что в клетке существует **RAD51 независимый путь рекомбинации** [Ira and Haber, 2002]. Предполагается, что в этом процессе основными факторами, осуществляющими рекомбинацию, являются белки RAD-семейства RAD50/59, и такой процесс представляет собой репарацию, индуцированную разрывом и объединенную со спариванием гомологий. Для **RAD51 зависимого пути** для спаривания цепей требуется 100 п.н., тогда как при осуществлении RAD50/59 рекомбинации требуется гомологичная последовательность протяженностью не более 30 п.н.

Существует другой вариант событий при репарации ДЦР (**Рисунок 4**), когда происходит захват второго конца разорванного дуплекса и формирование на матрице структуры Холлидея [Bärtsch et al., 2000; Helleday, 2003; Symington, 2005]. Для осуществления генной конверсии или формирования кроссоверного продукта по такому типу требуется гомологичное спаривание участка размером порядка 100–300 п.н. [Rubnitz, 1984; Ayares et al., 1986; Leung et al., 1997; Symington, 2005].

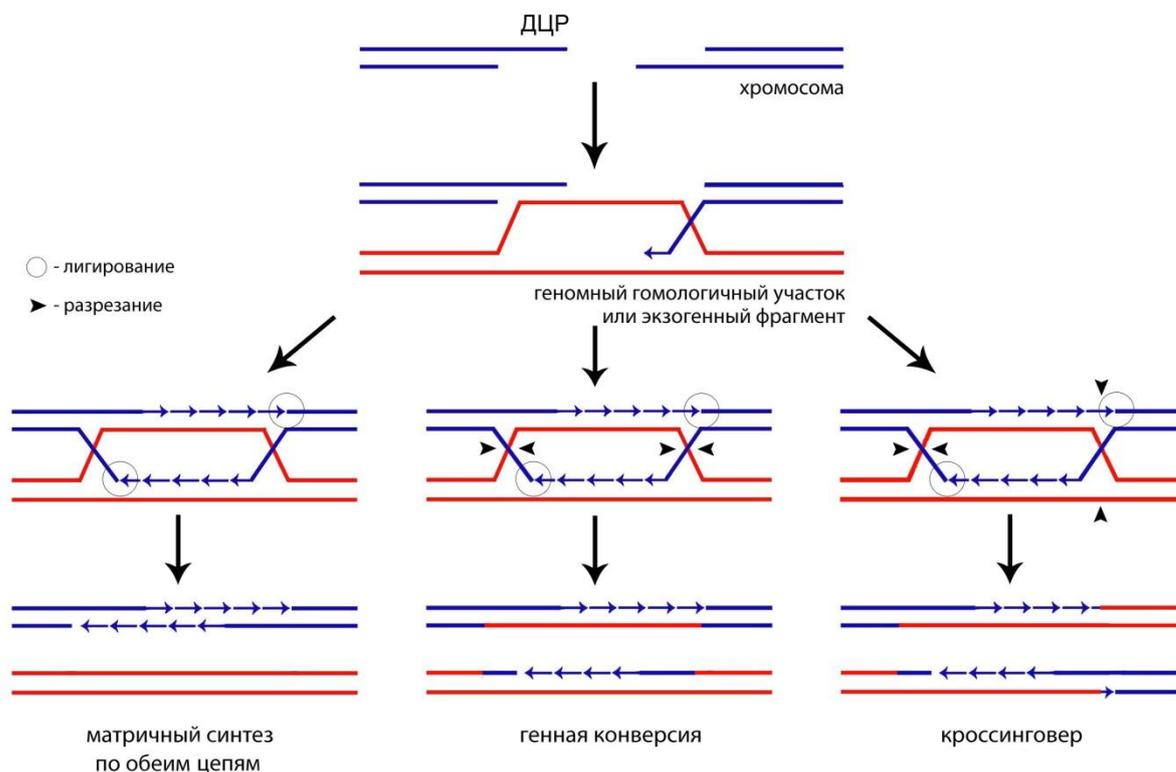


Рис. 4. Восстановление ДЦР консервативным механизмом, состоящим из гомологичного спаривания с последующим синтезом по обеим цепям. Возможны два варианта гомологичного обмена, включающие генную конверсию и кроссинговер. При реализации данного механизма гомологичного обмена необходимо ~300 п.н. общей гомологии для захвата и участия в репарации второго конца разорванного дуплекса [Bärtsch et al., 2000; Symington, 2005].

Рекомбинационным событиям предшествует активация системы контроля клеточного цикла, что приводит к замедлению репликации и аресту клеточного цикла до репарации повреждения. Система контроля клеточного цикла требует активации трансдуцирующих киназ ATM и ATR и фосфорилирования их эффекторных мишеней Chk1, Chk2, p53. В результате

активации систем контроля клеточного цикла репаративные белки концентрируются на участке в несколько миллионов п.н. по разные стороны от разрыва поврежденного дуплекса, где произошло фосфорилирование гистона H2AX, и формируют фокусы репаративной рекомбинации [Lisby et al., 2004]. Можно полагать, что при реализации этих механизмов, связанных с репарацией ДЦР, экстраклеточная ДНК или дцРНК с экстрахромосомной локализацией может использоваться в качестве донорной матрицы [Rodrigue et al., 2006; Kohzaki et al., 2007].

Третий вариант возможной гомологичной рекомбинации – это гомологичное спаривание участков концевой гомологии фрагментов (в оригинальных статьях – концов вектора внедрения или замещения) и интеграция внутренней части фрагмента в хромосому (может осуществляться по типу ends in или ends out), для осуществления которой не требуется присутствие ДЦР. При интеграции по типу «концов, расположенных внутри» (ends in), происходит сайтспецифическое внедрение фрагмента в геном и появление дополнительной генетической информации. При втором типе гомологичного обмена «концов, расположенных наружу» (ends out) происходит интеграция внутренней части структуры фрагмента с замещением участка хромосомы (**Рисунок 5**). При этом участок хромосомы, расположенный между найденными концевыми гомологиями, замещается без спаривания цепей внутренней части фрагмента и хромосомы.

Для обоих отмеченных способов гомологичной рекомбинации (ends in и ends out), согласно отмеченным работам, требуется более 1000 п.н. концевых гомологий для безошибочного гомологичного замещения [Ort-Weaver et al., 1981; Kucherlapati et al., 1984; Deng and Capecchi, 1992; Thomas et al., 1992; Hastings et al., 1993; Langston and Symington, 2004].

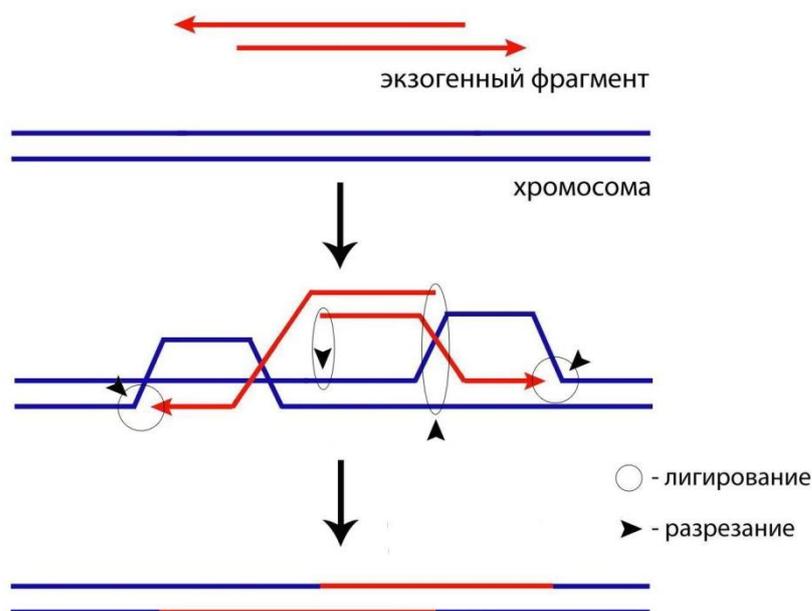


Рис. 5. Двойной реципрокный обмен между фрагментом ДНК экстрахромосомной локализации и соответствующим участком хромосомы за счет участков гомологии концов экзогенного фрагмента [Leung et al., 1997].

Описан также механизм интеграции экзогенного фрагмента ДНК в хромосому, осуществляемый при захвате и спаривании одной цепи экзогенного фрагмента. При этом происходит геновая конверсия между экзогенной ДНК и гомологичным участком хромосомы (**Рисунок 6**) [Leung et al., 1997; Helleday, 2003; Rodrigue et al., 2006]. Такой тип рекомбинации также требует достаточно протяженной гомологии между спаривающимся участком хромосомы и экзогенным фрагментом, составляющей не менее 1000 п.н.

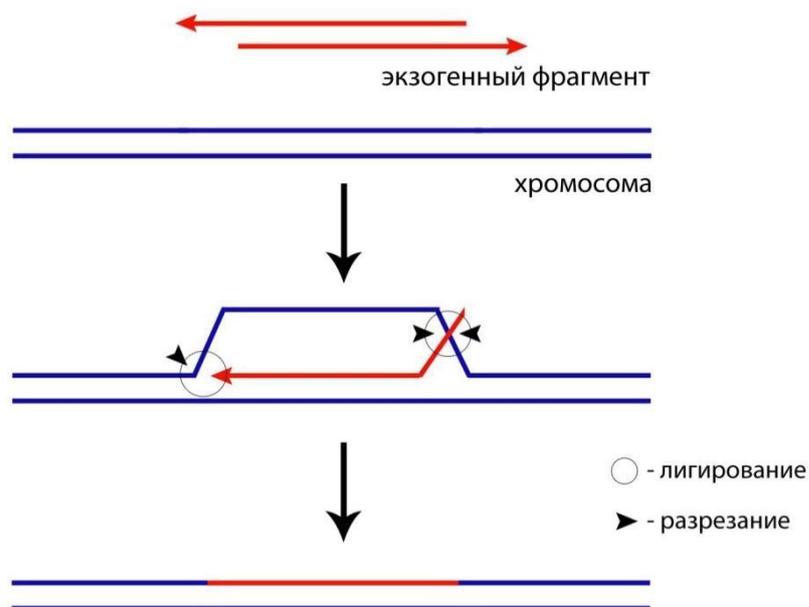


Рис. 6. Геновая конверсия между экзогенным фрагментом экстраклеточной локализации и соответствующим участком хромосомы [Leung et al., 1997].

Последние два варианта гомологичного обмена (**Рисунки 5, 6**), не требующие наличия ДЦР, могут использоваться клеткой на доступных участках транскрибируемой ДНК при захвате и проникновении в ядерное пространство фрагментов экзогенной ДНК.

Известно, что **молекулы РНК также могут выступать в качестве матрицы при репаративном синтезе** [Storici et al., 2007; Meers, Keskin and Storici, 2016; Keskin et al., 2014]. Экспериментально установлено, что в случае рибоолигонуклеотидов репарация искусственно индуцированного ДЦР проходит по РНК матрице, которая соединена с ДНК хромосомой, без участия обратной транскрипции [Storici et al., 2007]. Длина РНК матрицы должна быть более 45 п.н. Также показано, что эффективность репарации возрастает на несколько порядков в случае, если РНК олигонуклеотид содержит спаренный сегмент ДНК, гомологичный или центральной части РНК олигонуклеотида, или 3' или 5' его концу. Предполагается, что такой эффект связан с возможностью 3' конца ДЦР формировать ДНК дуплекс на РНК/ДНК матрице, что многократно увеличивает связывание с сайтом репарации полимеразы. Кроме того, обнаружено, что свисающий ДНК «хвост» значительно увеличивает эффективность репарации, что связывают с

протекторной функцией ДНК, защищающей РНК олигонуклеотид от деградации специфическими РНКазами.

В публикациях описаны следующие предположительные варианты участия РНК в репарации ДЦР в форме кДНК копии [Meers, Keskin and Storicì, 2016]:

1) Молекула РНК служит матрицей для построения кДНК. Синтезированная кДНК в двуцепочечной форме интеркалирует в место ДЦР и лигируется с разорванными концами. В результате этих событий формируется участок ДНК молекулы, содержащий встроенный участок кДНК.

2) Молекула РНК спаривается с коротким гомологичным одноцепочечным процессированным участком в месте повреждения. Ревертаза удлиняет интермедиат, достраивая его по матрице. Далее следует гомологичное спаривание синтезированной цепи кДНК, полимеразный синтез, лигирование концов. Опять формируется участок ДНК молекулы, содержащий встроенный участок кДНК.

3) по матрице РНК строится кДНК. Формируется двуцепочечная форма кДНК. За счет короткой гомологии двуцепочечная форма кДНК спаривается с участком ДНК ДЦР и происходит достройка ДНК по матрице кДНК. В итоге происходит лигирование и достройка по гомологичной цепи.

4) молекула РНК связывает два конца ДЦР по гомологичным сайтам и удерживает их, препятствуя расхождению концов ДНК и возможности её некорректной репарации. То есть, в данном случае не происходит синтеза, однако гомологичное спаривание способствуют правильной ориентации разорванных концов при репарации поврежденного участка (**Рисунок 7**). Ревертаза и теломераза не влияют на эффективность репарации по РНК-матрицы. Это указывало на отсутствие промежуточных продуктов кДНК, которые могли бы обеспечить репарацию матрицы кДНК. Связывание олигонуклеотидной РНК с поврежденным участком ДНК не зависит от Rad51. Нокаут генов дрожжевых транс-ошибочных ДНК-полимераз POL4, REV1, REV3, RAD30 или MIP1 не изменил эффективность репарации РНК-содержащими олигонуклеотидами. Эксперименты показали, что Pol α и δ являются наиболее вероятными кандидатами на обратную транскрипцию молекулой РНК при репарации DSB *in vivo*. Обнаружение синтеза ДНК на РНК-содержащих олигонуклеотидах классическими полимеразными, а также известная способность ДНК-лигазы I лигировать РНК-основания с синтезирующимися ДНК при созревании фрагментов Оказаки *in vitro* – экзотические процессы, которые трудно обнаружить, но которые, по-видимому, постоянно присутствуют при метаболизме нуклеиновых кислот.

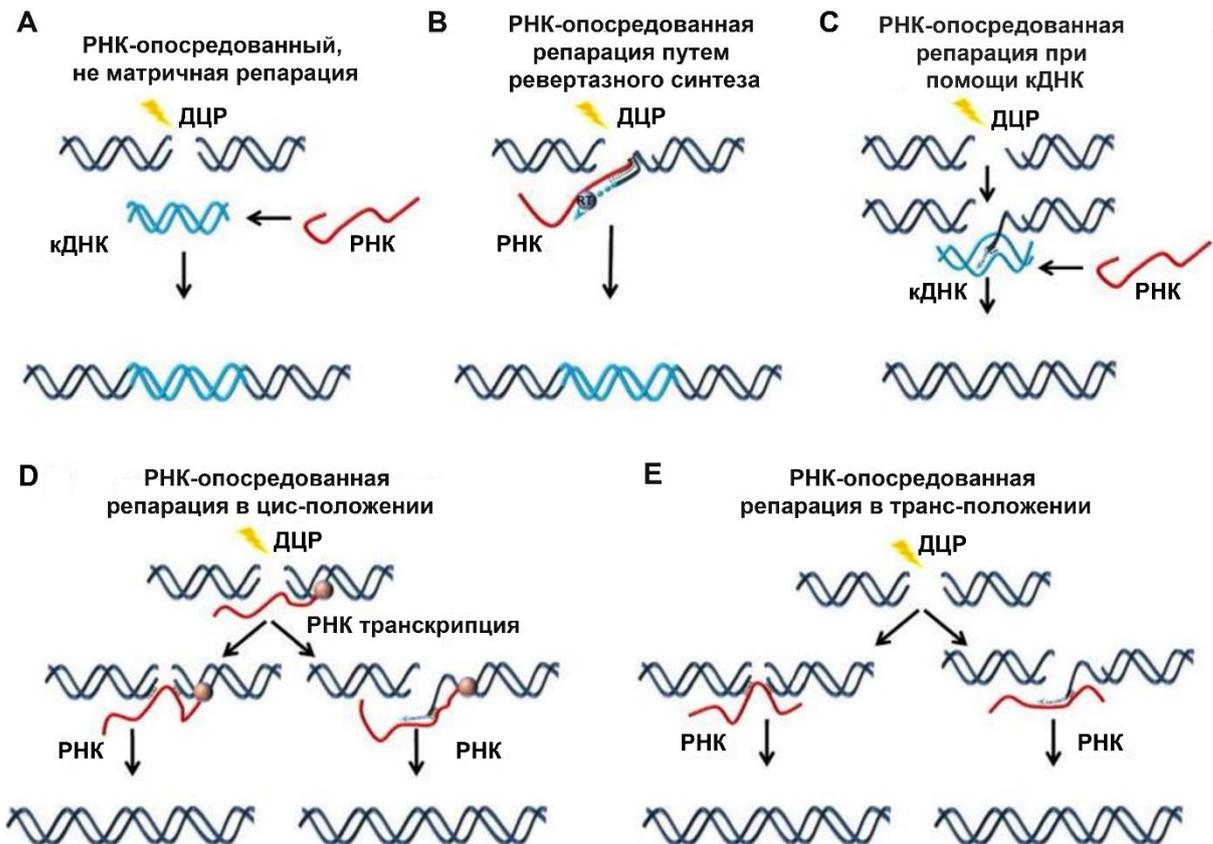


Рис. 7. Модели репарации, идущей с участием РНК матрицы. Цепи ДНК указаны темно синим, РНК красным, кДНК цепи голубым цветом. Место ДЦР обозначено оранжевой стрелкой. (А) Репарация ДЦР без участия внешней РНК матрицы. (В) Репарация ДЦР инсерцией кДНК, синтезированной по внешней РНК матрицы. Обратная транскриптаза отмечена голубым овалом. Светлая пунктирная линия-стрелка представляет ДНК, синтезированную обратной транскриптазой. (С) Репарация ДЦР с участием внешней РНК матрицы с использованием гомологичной кДНК. Небольшая черная линия демонстрирует аннилинг между ДЦР и кДНК. Пунктирная сине-серая линия представляет собой синтез с кДНК матрицы. (D) Репарация ДЦР с участием РНК матрицы в положении *in cis* (сопряженной с транскрипцией РНК матрицы) и (E) *in trans* (внешней РНК матрицы). Розовый овал представляет РНК полимеразу. Короткая черная линия показывает аннилинг между ДЦР и концом РНК молекулы. РНК или связывает разорванные концы (левая иллюстрация), или 3'-ДНК конец может быть удлинен с использованием РНК в качестве матрицы для полимеризации (правая иллюстрация). Пунктирная серо-голубая стрелка представляет синтез с РНК подложки [Meers, Keskin and Storic, 2016].

Известно, что помимо прямого действия (в роли матрицы при репарации ДЦР), фрагменты РНК обладают и другими функциями, способствующим репарации ДНК хромосом. Показано, что спонтанно возникающие ДЦР ДНК индуцируют эктопическую транскрипцию, в результате которой синтезируются короткие некодирующие РНК (DSB-induced small RNAs, diRNAs) размером ~21 нуклеотид [Francia et al., 2012]. Предполагается, что diRNAs привлекают ферменты репарации ДЦР ДНК к сайтам повреждений, тем самым способствуя репарации [Francia et al., 2012]. Недавно появились данные, указывающие на возможность поли(ADP-рибоз)илирования ферментами PARP1 и PARP2 концов разрывов ДНК [Talhaoui et al., 2016]. Не исключено, что этот процесс может вносить вклад как в ремоделирование хроматина, так и в репарацию ДНК [Talhaoui et al., 2016]. В отсутствие воздействий, индуцирующих повреждение ДНК, уровень PAR в клетках очень низкий, и (ADP-рибоза) присутствует в форме достаточно стабильных (время полураспада $t_{1/2}$ ~7.7 ч) моно- или олигомеров. Массированный локальный синтез

высокодинамичного полимера PAR ($t_{1/2}$ менее 1 мин) индуцируется возникновением повреждения в ДНК [Wielckens et al., 1983; Kreimeyer et al., 1984; Alvarez-Gonzalez and Althaus, 1989].

Таким образом, проведенный анализ предполагает существование молекулярной основы, определяющей участие экстраклеточных фрагментов дцРНК и дцДНК в репарации ДЦР различного происхождения.

1.6. Естественный захват фрагментов экстраклеточных нуклеиновых кислот стволовыми клетками – новый общебиологический феномен как основа их радиопротекторного действия

Исследуя взаимоотношения экстраклеточной дцДНК и эукариотической клетки, в лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН были обнаружены и охарактеризованы два неизвестных общебиологических явления, позволивших определить предполагаемую мишень и механизм радиопротекторного действия нуклеиновых кислот. Установлено, что 1) фрагменты экстраклеточной дцДНК интернализуются в низкодифференцированные клетки различного генеза, включая стволовые клетки крови, стволовые иницирующие раковые клетки, мезенхимальные стволовые клетки; 2) попавшие в стволовые клетки экстраклеточные фрагменты дцДНК участвуют в репаративном процессе таким образом, что нарушают естественный ход механизма репарации. При этом в зависимости от типа репаративного процесса или его фазы, участие экстраклеточной ДНК в процессе репарации может, как способствовать корректному завершению репаративного процесса (спасти стволовую клетку от апоптотической гибели), так и нарушить корректный ход репарации (индуцировать aberrантное восстановление поврежденной ДНК), что сопровождается апоптозом и элиминацией стволовой (опухолевой) клетки [Likhacheva et al., 2007 b; Долгова и др., 2009, 2014 a, b, c; Dolgova et al., 2012 a, 2013 a, 2014, 2015, 2016a, b; Поттер и др., 2016 a, b, c, d; Potter et al. 2016, 2017; Ritter et al., 2022].

Исследуя радиопротекторное действие препаратов ДНК, было обнаружено, что инъекции препарата в короткий промежуток времени после кратковременного облучения в абсолютно смертельной дозе спасают 60-90% экспериментальных мышей в период наблюдения до 90 суток [Likhacheva et al., 2007 b]. Одновременно было установлено, что анализируемые в лаборатории препараты РНК также обладают радиозащитным эффектом. Введение препарата суммарной РНК пекарских дрожжей за короткий промежуток времени до смертельного облучения спасает до 100% экспериментальных животных. Предполагается, что именно спасенные ГСК, мигрируя в кровотоки и достигнув селезенки, формируют новую кроветворную и иммунную систему, разрушенную облучением.

Было сделано предположение, что обнаружен абсолютно новый механизм радиозащитного действия, связанный с нахождением фрагментов экстраклеточных нуклеиновых кислот во внутреннем пространстве ГСК. Принципиально могут быть рассмотрены два различных механизма радиозащитного действия: 1) физическая защита хроматина доставленными извне фрагментами нуклеиновых кислот (по нашим данным, в ядре могут присутствовать 0,02% - 0,1% от генома клетки экстраклеточного материала нуклеиновых кислот [Dolgova et al., 2016a]); 2) спасение ГСК вследствие интерференции процесса репарации ДЦР, индуцированных ионизирующим излучением и свободными радикалами.

1.7. Заключение к литературному обзору

Ядерный хроматин и его организация являются важнейшим элементом существования клетки. Любые изменения в его пространственной организации в высшей степени чувствительны для нормального функционирования клеточных систем. В клетке активно функционируют молекулярные механизмы, позволяющие поддерживать и восстанавливать функциональную архитектуру хроматина. В этом процессе могут принимать участие и экстраклеточные фрагменты нуклеиновых кислот, которые, как было недавно показано, в значительном количестве доставляются в эукариотическую клетку [Likhacheva et al., 2007 b; Долгова и др., 2009, 2014 a, b, c; Dolgova et al., 2012 b, 2013 b, 2014, 2015, 2016 a, b; Поттер и др., 2016 a, b, c, d; Potter et al. 2016, 2017]. Фрагменты нуклеиновых кислот постоянно циркулируют в крови и интерстициальных жидкостях, при этом практически ничего не известно об их обороте в организме. Мы полагаем, что экстраклеточные нуклеиновые кислоты, циркулирующие в организме, могут представлять важный фактор в механизмах репарации ДНК.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

В работе были использованы самцы и самки мышей линий C57BR, C57BL/6 и CBA в возрасте от 2 до 6 месяцев (вес 18-24 г), выведенные в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» ИЦиГ СО РАН. Животных содержали группами по 6-10 мышей в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты с животными проводились в строгом соответствии с принципами гуманности в соответствии с Директивами Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Института цитологии и генетики СО РАН. Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации шейных позвонков.

2.2. Обработка мышей радиопротекторными препаратами

Суммарная РНК дрожжей (НПО Биолар, Латвия) либо двуцепочечная РНК (см. пункт 2.4.) вводились мышам внутривенно за 30-60 мин. до облучения в физиологическом растворе. Терапевтическая доза препарата составляла 7-10 мг суммарной РНК в 0,5 мл физиологического раствора и 160-200 мкг дцРНК в 0,2 мл физиологического раствора.

2.3. Облучение экспериментальных животных

Облучение мышей проводили на цезиевом источнике ионизирующего излучения ИГУР-1 (источник Cs¹³⁷) (в ИЦиГ СО РАН, до 2019 г.) дозой 9,4 Гр или 8 Гр при мощности дозы 0,76 Гр/мин. Подопытных и контрольных животных облучали группами по 9-10 животных, последовательно, в перфорированном контейнере размером 20x20x40 см, во избежание гипоксического шока. Радиопротекторное действие препарата оценивали по гибели экспериментальных животных в промежутки времени до 30-90 суток [Likhacheva et al., 2007 b].

2.4. Подготовка препарата дцРНК

1 г препарата сухой РНК (НПО Биолар, Латвия) растворяли в 10 мл DEPC H₂O и центрифугировали 10 мин, 3220 g, 20°C. Супернатант переносили в другую пробирку. Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Раствор РНК стерилизовали через фильтр 0,22 мкм (Millipor, Jet Bio-Filtration Co., Китай) и хранили при -20°C.

Хроматографию проводили на колонке объемом 10 мл, диаметром 1 см. Сухой гидроксипатит (С.Н. Boehringer Sohn AG & Co. KG, ФРГ) подвергали набуханию в 10 мл воды, после чего заполняли колонку. Колонку промывали теми объемами 0,01 М PBS. После нанесения на колонку раствора РНК, её промывали 30 мл 0,01 М PBS. Сначала 0,15 М PBS элюировали

одноцепочечную фракцию РНК, затем 0,25 М PBS элюировали двуцепочечную фракцию РНК. Смыв РНК контролировали на спектрофотометре.

Полученный при хроматографии раствор РНК в PBS диализовали против ТЕ-буфера (H₂O обработанная DEPC; 10 mM Tris-HCl, 10 mM ЭДТА, pH 7,4) при +4°C в течение суток с двумя сменами буфера. Диализованный раствор осаждали 1/10 объема ацетата натрия + 1 объем изопропанола. Осадок промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в физрастворе или DEPC H₂O [Остерман, 1985].

2.5. Качественная реакция на ДНК (реакция Дише)

Метод основан на способности дезоксирибозы образовывать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот. С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание. Дифениламиновый реактив представляет собой 1% (W/V) раствор дифениламина в смеси ледяной уксусной кислоты и 2,75% (W/V) концентрированной серной кислоты ($p_{20}=1,836$).

Препарат суммарной РНК (НПО Биолар, Латвия) гидролизovali в растворе едкого натра (0.1 М NaOH) 24 часа при 37°C, после чего раствор охладили до 0°C и добавили 5 М HClO₄ из расчета 0,2 мл раствора хлорной кислоты на 1 мл гидролизата. Смесь инкубировали 5 минут при 0°C и затем центрифугировали 15 минут при 5000 g. Осадок отмыли 70% спиртом и растворили в воде. Далее к нему добавили 2 объема дифениламинового реактива. Раствор инкубировали в течение 15-20 мин на кипящей водяной бане. В результате появлялось характерное для субстрата окрашивание [Шапиро, 1976].

2.6. Определение содержания ДНК по Спирину

Фракции РНК (НПО Биолар, Латвия) гидролизovali в растворе едкого натра (0.1 М NaOH) 24 часа при 37°C, после чего раствор охладили до 0°C и добавили 5 М HClO₄ из расчета 0,2 мл раствора хлорной кислоты на 1 мл гидролизата. Смесь инкубировали 5 минут при 0°C и затем центрифугировали 15 минут при 5000 g. Осадок отмыли 70% спиртом и растворили в 0,5 М HClO₄. Раствор грели на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Поглощение на спектрофотометре измеряли при 270 и 290 нм против контрольного раствора 0,5 М HClO₄.

Содержание дериватов рибонуклеиновых кислот в пересчете на Na-РНК (X) в препарате в процентах определяли по формуле [Spirin, 1958]:

$$X = \frac{(C_{270} - C_{290}) \times 10,2 \times (a + b + c) \times 100}{0,19 \times d \times 10^6 \times 0,1}, \text{ где:}$$

C_{270} и C_{290} – концентрация растворов при 270 и 290 нм;

10,2 – коэффициент пересчета содержания нуклеинового фосфора на содержание натрия рибонуклеата;

0,19 – разность удельных показателей поглощения (E) ДНК при длинах волн 270 и 290 нм при концентрации фосфора 1 мкг/мл;

l – толщина поглощающего слоя кюветы, см, либо 0,1 – если измерение проводили при помощи Nanodrop;

a – объем добавленного гидроксида натрия, мл;

b – объем добавленной хлорной кислоты, мл;

c – объем разведения сухой навески, мл;

d – навеска препарата в пересчете на сухое вещество, г;

10^6 – перевод граммов в микрограммы.

2.7. Клонирование и секвенирование молекул РНК, элюирующихся с гидроксиапатита 0,25 M PBS

Для получения кДНК с дцРНК использовалась система ревертазного синтеза и набор DOP-PCR master kit (ООО Медиген, Россия). Реакции проводились согласно прилагаемой инструкции. кДНК копии клонировали в вектор Bluescript, и трансформировали в электрокомпетентные клетки XL1- Blue MRF⁺. После анализа электрофоретической подвижности ДНК, выделенной из полученных трансформантов, отобранные клоны были секвенированы [Маниатис, 1984].

2.8. Контекстный анализ рекомбинантных клонов. Определение генной принадлежности полученных структур

Последовательности секвенированных клонов анализировали в программе Vector NTI (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Последовательности были выравнены и объединены в группы гомологии. Контекстный анализ, проводили на сайте <http://genome.ucsc.edu>, с использованием инструмента Vlat. Вторичные структуры анализировали на сайте <https://eu.idtdna.com>, с использованием инструмента OligoAnalyzer.

2.9. Рехроматография двуцепочечной фракции РНК

Рехроматографию проводили в тех же условиях, как при фракционировании суммарной РНК (НПО Биолар, Латвия). Рехроматографию проводили на двуцепочечной фракции без специальных обработок, а также после «денатурации» и после «ренатурации».

«Денатурация» – препарат дцРНК грели на водяной бане при 98°C 20 минут, после чего его быстро (в течении 1-3 минут) охлаждали до 37°C и переносили на ночь на 4°C.

«Ренатурация» – препарат дцРНК грели на водяной бане при 98°C 20 минут, после чего еще 20 минут выдерживали при 86°C и медленно (в течении 45 минут) охлаждали до 37°C.

Элюат анализировали спектрофотометрически.

Если требовалось, в раствор дцРНК до «денатурации» и «ренатурации» вносили 2 мкг/мл панкреатической РНКазы.

2.10. Выделение клеток костного мозга

Костный мозг вымывали при помощи шприца холодным PBS из бедренных костей мыши. Остатки тканей удалили путем фильтрации суспензии через «cell strainer» (40 мкм) (Corning Inc., США). Суспензию клеток осаждали и ресуспендировали в среде, используемой для дальнейшего анализа (PBS, RPMI-1640, DMEM, физиологический раствор).

2.11. Выделение клеток Кребс-2

Аденокарцинома Кребс-2 была любезно предоставлена к.м.н. Николиным В.П. (старший научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»). Клетки Кребс-2 культивировались в мышах линии СВА как описано в статье [Yushok, Mallalieu and Batt, 1956]. При помощи шприца из мышей СВА отбирали 20-50 мкл асцитной жидкости и ресуспендировали в 1 мл PBS. Суспензию дважды промывали в PBS и ресуспендировали в среде, используемой для дальнейшего анализа (PBS, RPMI-1640, DMEM, физиологический раствор).

2.12. Нарботка *Alu I* фрагмента, меченного TAMRA флуорохромом

Alu I фрагмент человека, клонированный в векторе Bluescript, нарабатывался методом ПЦР по M13 сайтам с добавлением уридина, меченного TAMRA-флуорохромом.

M13 for – GTAAAACGACGGCCAGT

M13 rev – CAGGAAACAGCTATGAC

Программа ПЦР:

1. 95°C – 5 мин. x 1
2. 95°C – 30 сек.
60°C – 40 сек. x 33
72°C – 40 сек.
3. 72°C – 3 мин. x 1
4. 4°C – ∞

2.13. Создание искусственной последовательности РНК

Искусственный РНК зонд представляет собой две гомологичные молекулы РНК, сконструированные на основе секвенированных клонов последовательностей дцРНК препарата суммарной РНК дрожжей (НПО Биолар, Латвия). Клоны выбирались так, чтобы их вторичная структура не мешала формированию дуплексов при отжиге. Была найдена комбинация последовательностей двух клонов, которая могла формировать три коротких АТ-богатых шпильки, с минимальными значениями энергии Гиббса.

Seq1: 5' -AUU AAC GAG AUU CCC ACU GUC CCU AUC UAC UAU CUA GCG AAA CAU AAU AGG CAU ACA AUU CCA CUG UA- 3'

Seq2: 5' -UAC AGU GGA AUU GUA UGC CUA UUA UGU UUC GCU AGA UAG UAG AUA GGG ACA GUG GGA AUC UCG UUA AU- 3'

Для синтеза комплементарных молекул РНК, содержащих флуоресцентный краситель 6-карбоксифлуоресцеин (6-FAM) на 3'-конце, был использован метод автоматического фосфитамидного твердофазного синтеза. Синтез проводят путем пошагового удлинения олигонуклеотидной цепи, ковалентно связанной с помощью "якорной" группы с нерастворимым полимерным носителем. Синтетический цикл состоит из четырех стадий: деблокирования 5'-гидроксильной группы, последующей конденсации с очередным синтоном, эспирования и окисления. Процесс повторяется до тех пор, пока олигомер не достигнет заданной длины, после чего проводят его полное деблокирование и выделение. Синтез был выполнен в лаборатории химии РНК ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН научным сотрудником, к.х.н. Мещаниновой М.И.

В части экспериментов дцРНК зонд дополнительно метили изотопом фосфора (P^{32}) (см. пункт 2.14.).

2.14. Включение метки на 5'-конец FAM-дцРНК с помощью полинуклеотидкиназы фага T4

10 мкг одноцепочечного РНК-адаптера инкубировали с 50 μ Ки γP^{32} -dATP (ИХБФМ СО РАН, Россия) в 50 мкл реакционной смеси, содержащей киназный буфер и 20 ед. T4-полинуклеотидкиназы (НПО "СибЭнзим", Россия). Смесь инкубировали 30 минут при 37°C. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до концентрации 20 мМ. Процент включения метки определяли счетчиком Гейгера, измеряя свечение до и после отмывки. Для отмывки 1 мкл реакционной смеси наносили на фильтр DE-81 (Whatman plc, UK) и отмывали 0,25 М PBS, pH 7,0. Меченую РНК экстрагировали 1 объемом фенол-хлороформа (в соотношении 1:1) и осаждали 3 объемами этанола. Сухой осадок растворяли в TE буфере [Мазин, Кузнецов, Краев и др., 1990].

2.15. Отжиг комплементарных цепей искусственно синтезированной молекулы РНК

Для отжига по 20 pmol комплементарных цепей молекул РНК, объединяли в 1x буфере для отжига цепей. Пробирку с РНК инкубировали в 300 мл стакане при 95°C 5 минут и медленно охлаждали до комнатной температуры. Отожженные цепи хранили при 4°C.

Буфер для отжига x10: 0,2 М Tris-HCl (pH 7,5); 0,1 М MgCl₂; 0,5 М NaCl.

2.16. *In vitro* интернализация меченой нуклеиновой кислоты в клетки костного мозга и клетки Кребс-2

500 тыс. клеток костного мозга или клеток Кребс-2 ресуспендировали в 200 мкл RPMI-1640 (Capricorn Scientific GmbH, ФРГ) и добавляли 0.1 мкг нуклеиновой кислоты, меченой флуорохромом (FAM-дцРНК или TAMRA-дцДНК). Далее клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте при комнатной температуре. После инкубации, клетки промывали средой и ресуспендировали в RPMI-1640 [Dolgova et al, 2012 a].

2.17. *In vitro* обработка антителами к c-Kit и CD34 клеток костного мозга и Кребс-2

Клетки костного мозга (из мышей линии C57BL/6) или Кребс-2 (из мышей линии CBA), ресуспендировали в 200 мкл PBS + 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific GmbH, Германия) и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре для блокировки. После этого клетки промыли PBS и инкубировали 30 минут в 100 мкл PBS с антителами c-Kit (BioLegend, США) в разведении 1:100 и антителами к CD34 (BioLegend, США) в разведении 1:50. Далее клетки отмывали, осаждали при 200 g цитоспином «Single Cytofunnel» (Shandon, Китай) на предметное стекло, покрывали DAPI-DAPCO (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и анализировали на микроскопе AxioImager.M1 (Carl Zeiss AG, ФРГ).

2.18. Анализ двуцепочечных разрывов ДНК при помощи антител к гистону γ -H2aX

Из мышей линии C57BL/6 выделяли костный мозг в 0.01 М PBS. Полученную суспензию клеток фиксировали добавлением равного объема 4%-го параформальдегида (pH 7,4) и инкубировали в течение 1 часа при +4°C. Суспензию клеток осаждали и промывали 0.01 М PBS, содержащим 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific GmbH, Германия). Клетки обрабатывали 0,1% Triton X-100 в этом же буфере в течение 10 мин. После промывки, осадок клеток ресуспендировали в 1 мл PBS (pH 7,4), содержащем 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и обрабатывали первичными антителами к модифицированному гистону γ H2AX (Product No: SAB5700329 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ФРГ) в разведении 1:1000 (1 мкл) в течение часа при комнатной температуре в темноте. После промывки клетки обрабатывали мечеными FITC козьими антителами против IgG кролика (Product No: AP132F Sigma-Aldrich

Chemie GmbH, ФРГ) в течение часа при комнатной температуре в разведении 1:500. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, США) [Dolgova et al, 2012 a].

2.19. Патоморфологический анализ органов

Органы фиксировались в нейтральном 4% формальдегиде и заливались в парафиновые блоки. Парафиновые срезы производились на микротоме RM2265 (Leica Biosystems GmbH, ФРГ), проводились через серию спиртов и окрашивались гематоксилин-эозином. Работа проводилась совместно с Тарановым О.С. (заведующий отделом микроскопических исследований ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека).

Для электронной микроскопии клетки фиксировали, добавляя к суспензии равный объем 8% формальдегида, обезживали по стандартной методике при возрастающих концентрациях этилового спирта и ацетона и помещали в смесь Эпон–аралдит. Ультратонкие срезы получали на микротоме Райхерта-Юнга (Австрия), контрастировали с уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol Ltd., Япония); изображения были получены с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры Veleta с боковым выходом (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, ФРГ). Изображения были обработаны и проанализированы с помощью программного обеспечения Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, ФРГ.

2.20. Подсчет лимфоцитарных колоний в селезенках мышей

Селезенки экспериментальных мышей выделяли на 9-10 день после облучения. Селезенки фиксировали и хранили в 4% параформальдегиде. Далее проводили визуальный подсчет лейкоцитарных колонии на поверхности селезенок.

2.21. Анализ функционального состояния гемопоэтических ростков клеток костного мозга

Клетки костного мозга выделяли из грудины и бедренных костей экспериментальных животных и высушивали на предметном стекле. Препараты клеток фиксировали метанолом в течение 6-10 минут и отмывали H₂O. После высушивания препараты окрашивали по Гимза-Романовскому (рН 7,4). Работа проводилась совместно с Дубатовой Т.Д. (научный сотрудник лаборатории клеточного деления ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН).

2.22. Анализ динамики накопления дцРНК-зонда в клетках *in vitro*

1 млн. клеток Кребс-2 переносили в 24 луночный планшет (Eppendorf SE, ФРГ) в 500 мкл среды RPMI-1640 (Capricorn Scientific GmbH, ФРГ). Планшет анализировали на конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Carl Zeiss AG, ФРГ). Первое изображение получали непосредственно перед добавлением FAM-дцРНК-зонда. Далее в лунку добавляли 0,1 мкг FAM-дцРНК и делали снимки через 5, 10, 20, 40 и 60 минут. Интенсивность свечения зонда внутри клетки анализировали в программе ZEN (Carl Zeiss AG, ФРГ). Во всех временных точках определяли интенсивность свечения одной и той же клетки.

2.23. Анализ деградации двуцепочечной и одноцепочечной РНК в плазме крови человека и мыши

Плазму крови выделяли центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин. В пробирке смешивали 10 мкл плазмы и 10 мкл физиологического раствора с 0,5 мкг РНК. Смесь инкубировалась при 20°C или 37°C. Реакцию останавливали добавлением 1 мкл 0,5 М, рН 8,5 ЭДТА и сразу добавляли равный объём фенол-хлороформа. Далее в каждую пробирку добавляли по 40 мкл H₂O и центрифугировали 2 мин. при 12000 g. Супернатант анализировали в 20% нативном полиакриламидном геле [Маниатис, 1984].

2.24. Анализ деградации двуцепочечной РНК в крови мыши *in vivo*

Мышам вводили внутривенно 2 мкг P³²-дцРНК в 200 мкл физиологического раствора. Через 5, 60 и 180 минут у мышей из хвостовой вены отбирали 10 мкл крови в пробирку с 10 мкл 0,02 М ЭДТА. Содержание метки в образцах измеряли счетчиком Гейгера.

Далее образцы крови наносили на 2% агарозный гель и проводили электрофорез. После этого гель высушивали, экспонировали с рентгеновской пленкой «CP-BU NEW» (Agfa-Gevaert NV, Бельгия) и анализировали рампределение радиоактивно меченого материала.

2.25. Стимуляция колониеобразования примитивных гемопоэтических предшественников препаратом дцРНК на метилцеллюлозе

1 млн. клеток костного мозга инкубировали с 0,2 мкг/мл дцРНК в 400 мкл. среды IMDM (Capricorn Scientific GmbH, Германия) + 2% эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific GmbH, Германия) на протяжении 2-2,5 часов в CO₂ инкубаторе (Memmert GmbH, ФРГ), при 5% CO₂, 95% влажности и 37°C. Для количественного определения миелоидных предшественников, 90 тыс. клеток костного мозга ресуспендировали в 300 мкл IMDM + 2% эмбриональной бычьей сыворотки и добавляли к 3 мл метилцеллюлозной среды MethoCult M3434 (STEMCELL Technologies Inc., Канада), после чего клеточную суспензию высевали на чашки Петри (по 1,1 мл на чашку) и инкубировали при 5% CO₂, 95% влажности и 37°C в CO₂

инкубаторе (Memmert GmbH, ФРГ) в течение 7-10 дней. Колонии анализировали при помощи сетки STEMgrid -6 (STEMCELL Technologies Inc., Канада) на микроскопе Axiovert 40 C (Carl Zeiss AG, ФРГ). Колонии подсчитывали на 3 чашках. По полученным данным вычисляли среднее значение и стандартное отклонение. Методика взята из инструкции к MethoCult M3434 (STEMCELL Technologies Inc., Канада).

2.26. Анализ внутриклеточной локализации флуорохромной метки (дцРНК) при помощи DIC/флуоресцентной-микроскопии

Клетки инкубировали с FAM-дцРНК-зондом, как было описано ранее (см. пункт 2.16.), отмывали и ресуспендировали в среде RPMI-1640 (Capricorn Scientific GmbH, ФРГ). Далее клетки переносили в 24-луночный планшет для микроскопического анализа (1 млн. клеток в 500 мкл среды). Путем совмещения дифференциальной интерференционно-контрастной и флуоресцентной микроскопии была получена галерея оптических срезов клетки и регистрируемой в ней FAM-метки. Оптические срезы объединяли в цельное трехмерное изображение в программе ZEN (Carl Zeiss AG, ФРГ). Микроскопия проводилась в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН с использованием прибора LSM 780 NLO (Carl Zeiss AG, ФРГ).

2.27. Электрофорез клеток Кребс-2 в свободном объеме

10 млн. клеток Кребс-2 ресуспендировали в 1 мл среды AMEM (Capricorn Scientific GmbH, Германия) и переносили в диализную мембрану, закрытую с двух сторон перемычками. Диализный мешочек с клетками помещали в камеру для электрофореза так, чтобы с противоположенных концов под мешочек были подоткнуты полоски фильтровальной бумаги. Бумага была смочена ТАЕ-буфером и уходила другим концом в ваночки с электродами, заполненными ТАЕ-буфером. Сам диализный мешочек при этом находился выше и с ТАЕ-буфером на прямую не контактировал.

Электрофорез проводили в камере длиной 16 см при 64 В, 30 минут. После этого диализный мешочек пережимали по центру и отбирали клетки с «+» и «-» концов. Клетки сразу центрифугировали и переосаждали в свежем AMEM (Capricorn Scientific GmbH, Германия) [Харамоненко, Ракитянская 1974].

2.28. Гель-электрофорез клеток Кребс-2 в свободном объеме

400 тыс. клеток Кребс-2 инкубировали в 100 мкл физиологического раствора с 0,2 мкг FAM-дцРНК 5 минут при комнатной температуре. После этого клетки отмывали и ресуспендировали в 100 мкл физиологического раствора. 50 мкл суспензии осаждали

цитоспином на предметное стекло. Сверху наносили 20 мкл раствора DAPI-DAPCO (Thermo Fisher Scientific Inc., США) + 2% легкоплавкая агароза (1:1) и накрывали покровным стеклом (раствор имел температуру 40°C). Готовый препарат остужали в холодильнике 5 минут.

После застывания препарат помещали в электрофорезную камеру. К предметному стеклу с противоположенных сторон прикладывали полоски фильтровальной бумаги, смоченные ТАЕ-буфером. Другой конец полосок опускали в ванночки с буфером, в которых находились электроды. Предметное стекло при этом напрямую с ТАЕ-буфером не контактировало.

Электрофорез проводили в камере длиной 16 см при 64 В в нативных условиях (по аналогии с работой Rydberg, Johanson 1978).

2.29. Обработка клеток Кребс-2 катионным красителем BasicBlue41

4 млн. клеток Кребс-2 20 минут инкубировали в 300 мкл раствора BasicBlue41 (BB41) в физиологическом растворе (14 мкг/мл*) при комнатной температуре. Далее клетки отмывали и ресуспендировали в физиологическом растворе.

**Оптимальную концентрацию красителя определили ранее путем раститровки клеток и определения интенсивности их окрашивания.*

2.30. Ингибирование интернализации дцРНК в клетки Кребс-2 гепарином

Клетки Кребс-2 ресуспендировали в PBS (500 тыс. клеток/мл). Далее в пробирки добавляли гепарин (РУП Белмедпрепараты, Беларусь) (0,1 – 4 Ед./мл) и инкубировали 30 мин при 37°C. После этого клетки отмывали и ресуспендировали в 200 мкл PBS. Отмытые клетки инкубировали с FAM-дцРНК и делали препараты (по аналогии с работой Чинак и др. 2016).

2.31. Анализ крови мышей после облучения

Мышей облучали γ -радиацией дозой 8 Гр (ЛД_{50/30}). После этого каждый второй день у мышей забирали кровь из хвостовой вены и делали мазки. Мазки окрашивали по Романовскому-Гимзе рН 7,4. Предметные стекла исследовали с помощью микроскопа Leica DV 4000V ((Leica Biosystems GmbH, ФРГ)) в проходящем свете с иммерсией, увеличение $\times 100$. Поскольку объем образцов крови, которые можно было взять из хвостовой вены, был недостаточен для полного анализа крови, особенно для точного подсчета количества клеток в мл, были задействованы необычные методы. Относительное количество лейкоцитов (RNL), рассчитанное как отношение количества лейкоцитов (Nlt) к количеству эритроцитов (Net), определяли для каждого образца. Далее, эти относительные числа, определенные для экспериментальных точек, были выражены в процентах от исходного значения (Nl0/Ne0, обозначаемый как 100%) по следующей формуле: $RNLt(\%) = (Nlt/Net)/(Nl0/Ne0) \times 100$.

2.32. Анализ мутагенной активности препарата дцРНК

Мутагенную активность дцРНК оценивали путем анализа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга через 24 часа после внутрибрюшинного введения 100 мкг препарата на мышшь (n=5). У каждого животного было исследовано по сто метафаз.

2.33. Выделение фактора связывания дцРНК при помощи биотинилированного P³²-дцРНК зонда

50 млн. клеток Кребс-2 ресуспендировали в 4 мл физиологического раствора. К суспензиям добавляли 1 мкг P³²-био-дцРНК (биотинилированный дцРНК-зонд, меченный P³²-γАТР) и инкубировали 5 минут при 20°C. Далее клетки отмывали и ресуспендировали в 5 мл ледяного физиологического раствора. Суспензию переносили в пластмассовые чашки Петри и 10 минут инкубировали в УФ-печи (Bio-Link BLX) (3 Дж, 254 нм). В это время чашки стояли на льду и без крышки. После этого клетки дважды отмывали и 10 минут инкубировали во льду в 4,5 мл лизирующего буфера (1 mM PMSF, 1 мкг/мл aprotinin, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl (pH=8), 0,5 % triton-X100, 1 M NaCl). После лизиса к клеткам добавляли 20 мкл магнитных бидсов со стрептавидином «Dynabeads M-280 Strptavidin» (Thermo Fisher Scientific Inc., США) и инкубировали, при постоянном помешивании, 30 минут при 20°C. Далее бидсы отмывали 7 раз в растворе «washing buffer» (5 mM Tris-Cl (pH=7,5), 0,5 mM EDTA, 1 M NaCl) + 0,1% Tween, при этом бидсы придерживались при помощи магнита. Наконец осадок бидсов ресуспендировали в 30 мкл 0,1 M NaCl, добавили 10 мкл 4x sample buffer и кипятили 10 минут. Методика взята из рекомендаций «Thermo Fisher Scientific Inc., США».

С полученным образцом проводили форе́з по Лэмли в нативных условиях, в градиентном полиакриламидном геле (4-15%) (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Гель высушивали и проявляли на радиографической пленке «CP-BU NEW» (Agfa-Gevaert NV, Бельгия) [Маниатис, 1984].

2.34. Анализ интернализации P³²-дцРНК-зонда в клетки и ядра клеток Кребс-2

40 млн. клеток Кребс-2 инкубировали в 4 мл физиологического раствора с 2 мкг P³²-FAM-дцРНК 30 минут, 37°C. Далее клетки отмывали и ресуспендировали в 10 мл среды RPMI-1640 (Capricorn Scientific GmbH, ФРГ) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific GmbH, Германия). Клетки сортировали по признаку «FAM+» и «FAM-» на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, США).

При анализе клеток в результате было отсортировано 3 млн. «FAM+» клеток. Из них выделяли РНК тризолом (смотри пункт 2.35.) и разделяли в нативном 20% полиакриламидном геле.

При анализе ядер клеток было отсортировано 700 тыс. «FAM+» клеток. Клетки отмывали и лизировали в 4 мл раствора PBS, 0.5% triton-X100, 0.5 mM PMSF, 1 мкг/мл aprotinin, 10 минут при 0°C. Ядра осаждали 8 минут при 500 g. Ядра лизировали замораживанием и оттаиванием, после чего ресуспендировали в 20 мкл H₂O и разделяли в 20% нативном полиакриламидном геле.

Гели высушивали и делали автордиограмму [Маниатис, 1984].

2.35. Выделение РНК из клеток тризолом

Клетки растворяли в тризоле (Thermo Fisher Scientific Inc., США) (объем клеток/ тризол = 1/10). Клетки с тризолом инкубировали 5 минут при 65°C. Суспензию центрифугировали при 14000 g, 10 минут и продолжили инкубировать 10 минут при 65°C. Далее к суспензии добавили равный объем хлороформа и перемешали. Водную фазу отделили центрифугированием в течение 10 минут при 14000 g. После этого к водной фазе добавили 1/10 объема 3M ацетата натрия, рН5.2 и 3 объема EtOH и инкубировали 10 минут в морозилке. РНК осаждали в течение 30 минут при 20000 g при 4°C. Выделение проводилось в соответствии с рекомендациями производителя тризола (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

2.36. Анализ накопления радиоактивно меченного материала в тканях и органах экспериментальных животных после внутривенного введения P³²-дцРНК

Мышам (линия C57BL/6) внутривенно в 200 мкл физиологического раствора вводили 2 мкг P³²-дцРНК зонда или 6 млн. клеток костного мозга, предварительно обработанных P³²-дцРНК зондом (см. пункт 2.16.) и тщательно отмытых так, чтобы в надосадочной жидкости не регистрировалось радиоактивного сигнала. Клетки костного мозга вводили интактным мышам или мышам с индуцированной лейкопенией (за три дня до введения меченных клеток костного мозга мышам вводили циклофосфамид (BAXTER ONCOLOGY, GmbH, ФРГ) из расчёта 6 мг/мышь [Николин и др. 2006]).

Через три часа после инъекции из мышей выделяли органы: мозг, легкие, сердце, печень, почки, селезенку, желудок, кишечник, кровь и костный мозг. Цельные органы и ткани переносили в сцинтилляционные вials для дозиметрии. Дозиметрия проводилась с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика «РАКБЕТА» (ЛКВ, Швеция). Значения нормировали на массу соответствующего органа.

2.37. Обработка клеток ингибиторами эндоцитоза

1 млн. клеток Кребс-2 ресуспендировали в 500 мкл среды АМЕМ (Capricorn Scientific GmbH, Германия). В суспензию клеток добавляли ингибитор в концентрациях, указанных в разделе «Результаты». Инкубацию проводили 30 минут при 20°C. После этого клетки промывали и ресуспендировали в 200 мкл АМЕМ. Клетки обрабатывали FAM-дцРНК, доводили до 500 мкл и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, США) [Чинак и др. 2016].

2.38. Оценка динамики ДЦР по относительному количеству гистона γ -H2AX

Костный мозг мышей выделяли через 30, 60 и 120 минут после облучения дозой 9,4 Гр. Суспензию клеток костного мозга фиксировали добавлением равного объема 4% параформальдегида, после чего их инкубировали 1 час при 4°C. Далее суспензию промывали и ресуспендировали в PBS+ 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific GmbH, Германия). Проницаемость мембран нарушали добавлением 0,1% Triton X-100, 10 минут. После этого клетки отмывали и ресуспендировали в 1 мл PBS + 10% эмбриональной бычьей сыворотки с кроличьими антителами к гистону γ -H2AX (anti-phospho-histone Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ФРГ) в разведении 1:1000. Клетки инкубировали с антителами 3 часа при комнатной температуре. Далее клетки отмывали, ресуспендировали в PBS + 10% эмбриональной бычьей сыворотки с FITC мечеными козьими антителами против IgG кролика (goat anti rabbit IgG FITC-conjugate Sigma-Aldrich Chemie GmbH, ФРГ) в разведении 1:500 и так же инкубировали 3 часа при 20°C. После этого клетки промывались в PBS + 10% эмбриональной бычьей сыворотки и ресуспендировали в PBS. Цикл репарации анализировали по росту и спаду количества FITC+ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III (Becton, Dickinson and Company, США) [MacPhail et al. 2003].

2.39. Оценка относительного количества белков XRCC4 и RAD51 в клетках костного мозга облученных мышей

Костный мозг вымывали холодным PBS из бедренных костей мыши через 30, 60, 120 и 240 минут после облучения. Остатки тканей удалили путем фильтрации суспензии через «cell strainer» (40 мкм) (Corning Inc., США). Далее клетки отмыли 2 раза в PBS и инкубировали 30 минут при 4°C в лизирующем буфере (150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM PMSF; 1 мкг/мл aprotinin; 10 mM EDTA). 40 мкл лизата разделили в 10% нативном полиакриламидном геле и перенесли на нитроцеллюлозную мембрану [Маниатис, 1984]. Мембрану инкубировали 3 часа в 5% растворе обезжиренного молока + PBS, после чего её поставили инкубироваться на ночь при 4°C в том же растворе молока с добавлением первичных антител к RAD51 (A6268, ABclonal Inc., США), XRCC4 (A1677, ABclonal Inc., США) и β -actin

(AC026, ABclonal Inc., США). После инкубации мембрану трижды отмывали в растворе PBS + 0,02% Tween и ставили инкубироваться на ночь при 4°C с вторичными антителами с пероксидазой хрена (SSA003, Sino Biological Inc., Китай). После этого мембрану снова трижды отмывали и проявляли. После проявки интенсивность бандов анализировали программой Gel-Pro Analyzer. Интенсивность бандов нормировали на β -actin.

Проявитель (10 мл): 0,03% CoCl₂; 6 мг бензидина; 0,1 М Трис-HCl, pH 8; 3% H₂O₂

2.40. Введение препарата Б-190

Препарат Б-190 (ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА, Россия) вводился в желудок мышам с помощью специального зонда за 20 минут до облучения. Препарат измельчили и ресуспендировали в растворе H₂O с tween-20. Мышам вводили 2,5 мг/мышь в 0,25 мл суспензии.

2.41. Статистическая обработка

Для анализа выживаемости проводили Log-rank тест, используя функцию survdiff из R пакета survival v3.5-5. Кривые попарно сравнивали с контролем, после чего делали поправку на множественные сравнения, используя поправку Бонферони.

Достоверность в оценке мутагенности препарата дцРНК анализировали путем сравнения групп по Манна-Уитни U-тест.

Значения СРМ (события в минуту) нормировали на массу исследуемого органа или образца ткани. Достоверность отличий в накоплении органами меченных клеток костного мозга проводили Kruskal-Wallis тест с последующим post hoc анализом тестом Данна.

Ингибирование эндоцитоза анализировали методом парного теста Вилкоксона относительно не обработанного ингибитором контроля.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Часть I. Поиск и характеристика активной субстанции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей ее радиозащитные свойства

3.1. Эффект пролонгированного радиопротекторного действия препарата дрожжевой РНК

В начале разработки темы был проанализирован радиозащитный эффект нескольких партий коммерческого препарата суммарной РНК, выделенной из пекарских дрожжей (НИКТИ БАВ ГНЦ ВБ «Вектор», Россия). Сравнительный анализ свидетельствовал, что ни остаточные белки, ни общее содержание в препарате РНК не коррелируют с радиозащитным действием. Этот факт означал, что активной субстанцией, придающей препарату суммарной РНК радиопротекторные свойства, является некое иное вещество или иная структура мажорной компоненты препаратов РНК (Таблица 1).

Таблица 1. Радиопротекторные свойства нескольких партий коммерческого препарата суммарной РНК дрожжей *S. cerevisiae*. * Радиозащитный эффект оценивали на 10-ти мышах линии СС57BR, облученных абсолютно летальной дозой γ -радиации, по проценту выживших животных через 30 дней после облучения.

Содержание РНК (%)	Содержание белка (%)	Защитный эффект* (%)
71	2,4	25
75	2,0	13
75	2,8	0
76	1,5	70
73	1,8	100
72	0,54	0
82	0,48	80
81	0,44	20
72	0,4	90
86	0,24	70

Для проведенных последующих исследований был использован коммерчески доступный препарат дрожжевой РНК, продемонстрировавший в предварительных тестах 100% радиозащитный эффект при летальной дозе облучения в 9,4 Гр. На первом этапе была оценена длительность радиозащитного действия препарата РНК дрожжей. Очищенная стерильная РНК дрожжей вводилась экспериментальным животным внутривенно в количестве 7 мг за 1 час, за 4, 8 и 12 суток до облучения летальной дозой радиации 9,4 Гр. Результаты эксперимента приведены на **Рисунке 8**. Оказалось, при облучении, проводимом через 1 час и на 4 сутки от введения препарата РНК, к 70 суткам наблюдения выживает 100%, а при облучении на 8 и 12 сутки – 60% животных.

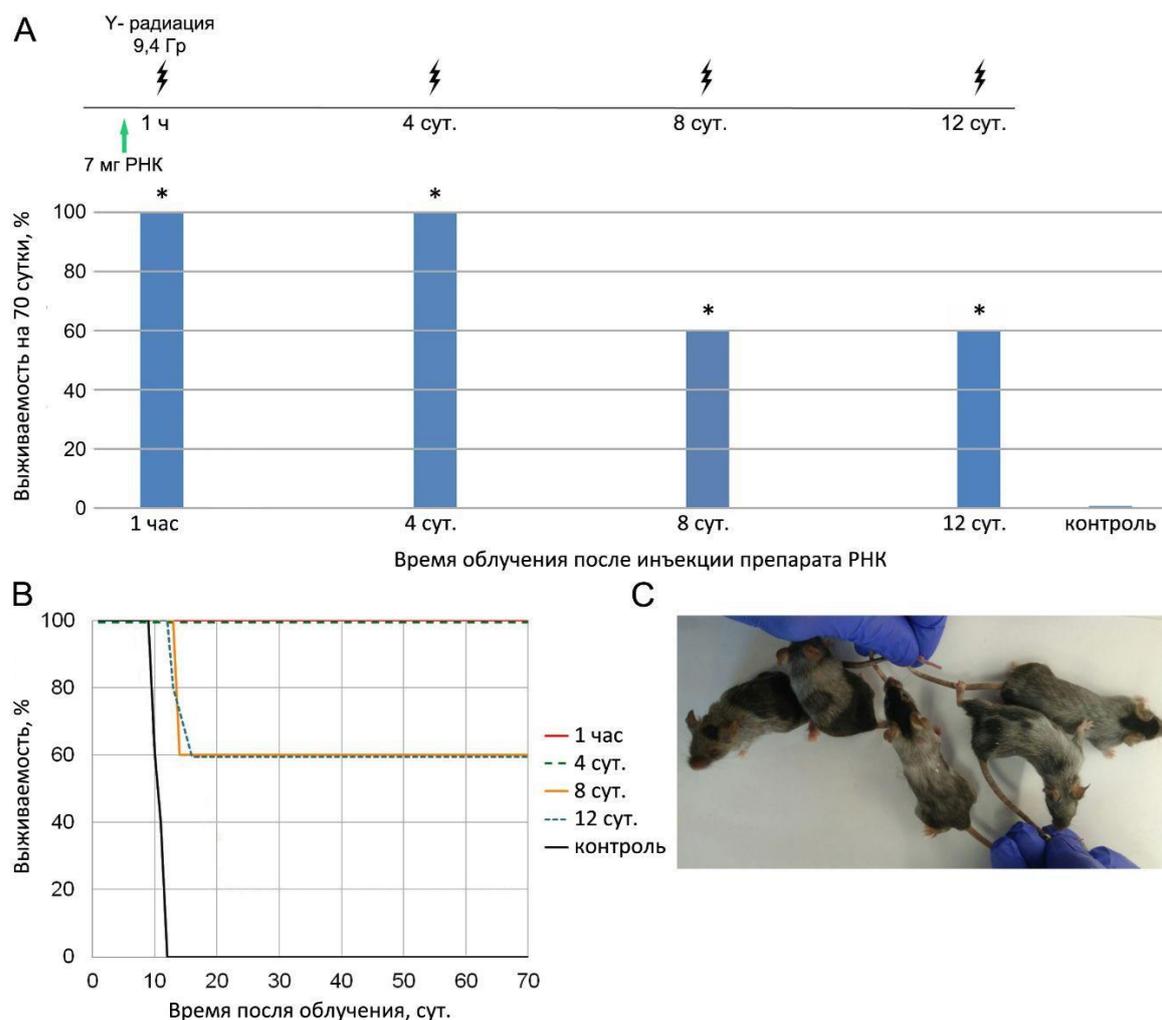


Рис. 8. Характеристика пролонгированного радиопротекторного действия препарата РНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*, при облучении абсолютно летальной дозой 9,4 Гр. А) Схема эксперимента и диаграмма выживания мышей (n=5), * p<0,05. В) График выживания экспериментальных групп. С) Животные, облученные на 4 сутки после введения препарата суммарной РНК дрожжей, через 90 суток после облучения.

3.2. Радиопротекторное действие двух фракций дрожжевой РНК

Что является активным началом, определяющим радиопротекторный эффект препарата РНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*?

Аналитическое исследование препарата суммарной РНК дрожжей свидетельствовало, что в препарате присутствуют две четко разграниченные фракции, одна из которых элюируется с гидроксиапатита как одноцепочечная РНК при элюции 0,15 М PBS. Вторая фракция элюируется в условиях, характерных для двуцепочечных нуклеиновых кислот, при 0,25 М PBS (**Рисунок 9**).

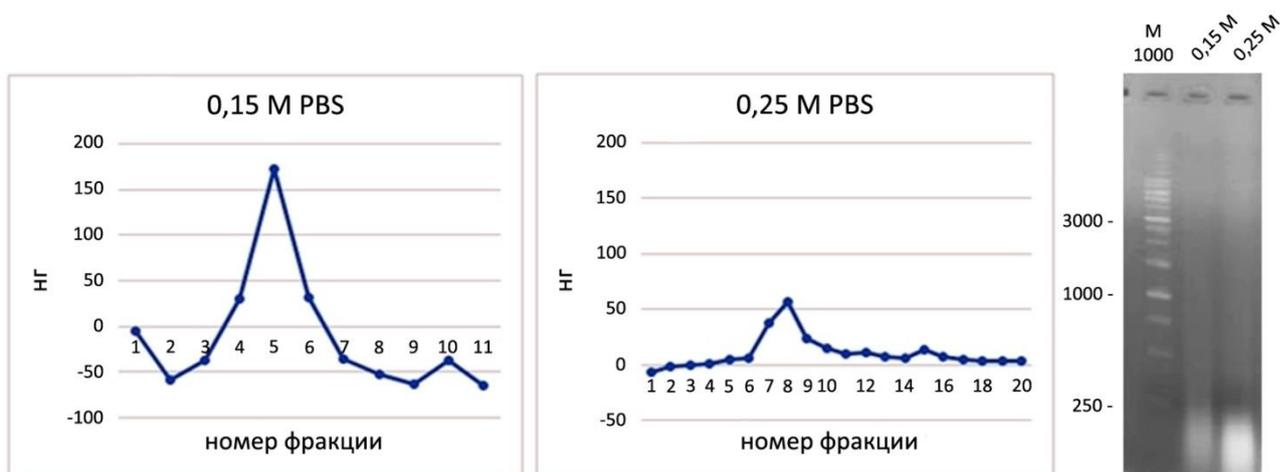


Рис. 9. Хроматография суммарной РНК дрожжей на гидроксиапатите. На графиках представлены профили элюции нуклеиновых кислот в 0,15 М и 0,25 М PBS. В правом блоке представлен электрофоретический анализ подвижности фракций нуклеиновых кислот 0,15 М и 0,25 М в 1% агарозном геле, окраска бромистым этидием. М – маркер молекулярного веса 1 т.п.н.

Проведенные эксперименты по радиопротекции обеих фракций свидетельствовали, что радиопротекторные свойства характерны только для фракции, элюирующейся в 0,25 М PBS. При этом количество вводимого препарата, необходимого для радиопротекторного действия, многократно сокращалось. Если для достижения 80-100% радиозащитного эффекта требуется ~7 мг препарата РНК на мышь, то при использовании фракции, элюирующейся в 0,25 М PBS, количество препарата, равное 160 мкг на мышь, полностью защищает животное от абсолютно летальной дозы γ -облучения (**Рисунок 10**).

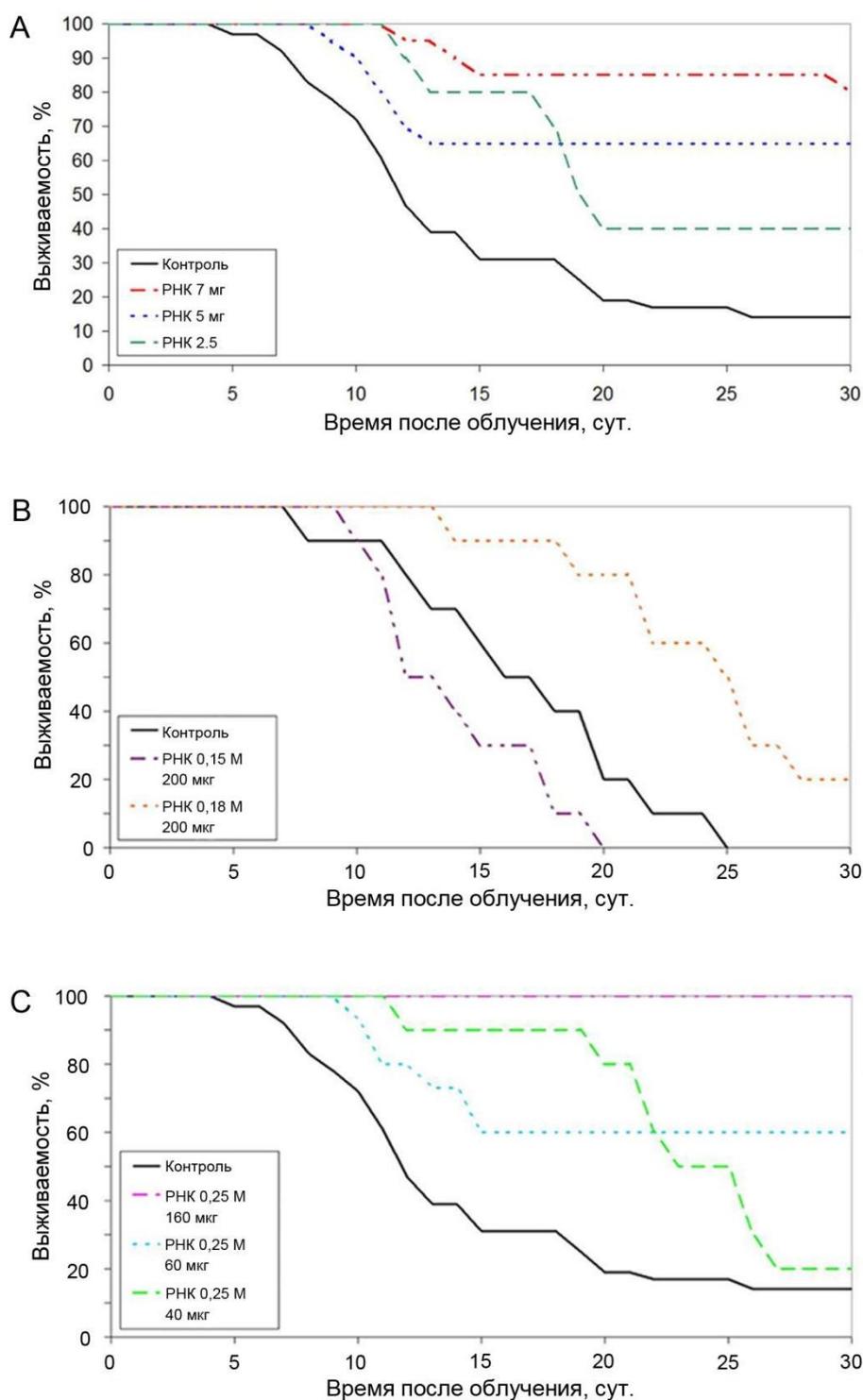


Рис. 10. Радиопротекторное действие препарата суммарной РНК и ее фракций, полученных элюцией с гидроксиапатита 0,15 М, 0,18 М и 0,25 М PBS. Мышей-самцов СВА облучали на γ -установке (^{137}Cs) дозой в 9,4 Гр при мощности дозы 0,76 Гр/мин. Препараты вводили внутривенно за 40 мин до облучения. А) препарат суммарной РНК в дозах 7 мг (n=20), 5 мг (n=20) и 2,5 мг (n=20), контроль (n=30), $p < 0.05$; В) фракции РНК, полученные при элюции 0,15 М и 0,18 М PBS, в дозе 200 мкг (n=10), контроль (n=10), $p < 0.05$; С) фракция РНК, полученная элюцией 0,25 М PBS, в дозах 160 мкг, 60 мкг и 40 мкг (n=10), контроль (n=30), $p < 0.05$.

3.3. Характеристика типа нуклеиновых кислот, составляющих фракцию 0,25 М

Одним из интригующих вопросов, касающихся фракции дрожжевой РНК, обладающей радиопротекторным действием, элюирующейся в условиях, характерных для двуцепочечных

структур ДНК или РНК (0,25 М PBS), был вопрос о типе нуклеиновых кислот этой фракции. В этой связи были проведены эксперименты по характеристике молекулярного состава обеих фракций суммарной РНК дрожжей.

Для исследования, как и для экспериментов по радиопротекции, фракционирование нуклеиновых кислот препарата дрожжевой РНК осуществляли методом адсорбционной хроматографии на колонке с гидроксипатитом. Были проведены многочисленные независимые выделения, в которых были получены близкие результаты. Размер элюирующихся нуклеиновых кислот находился в пределах 50-400 п.н. (**Рисунок 9**).

Для определения типа нуклеиновых кислот фракций, были проведены различные эксперименты с использованием обработки нуклеазами (ДНКаза I, SI нуклеаза) после денатурации или щелочью, или кипячением, или без таковой, которые не дали однозначно трактуемых результатов. В результате, для анализа принадлежности анализируемой фракции к тому или иному типу нуклеиновых кислот был выбран метод анализа нуклеиновых кислот, описанный в работе Спирина [Spirin, 1958, модифицированный согласно Шмидта-Таннгаузера]. Расчет содержания нуклеиновых кислот в гидролизованной фракции велся согласно формуле, приведенной в работе Спирина [Spirin, 1958]. В **Таблице 2** приведены результаты проведенных измерений. При осаждении хлорной кислотой не удалось визуализировать выпадения какого-либо значимого осадка, что косвенно свидетельствовало об отсутствии в образце ДНК. Также проведенный спектрофотометрический анализ содержания вещества нуклеиновых кислот в предполагаемом осадке после центрифугирования и перерастворения подтвердил предыдущее наблюдение об отсутствии материала нуклеиновых кислот во фракции, осажденной хлорной кислотой. Супернатант обеих фракций был проанализирован на содержание фосфора, как это требуется по методу Спирина в модификации Шмидта-Таннгаузера.

Таблица 2. Результаты измерения содержания дериватов нуклеиновых кислот в супернатанте после гидролиза слабой щелочью в образцах «0,15 М» и «0,25 М» при длинах волн 270 нм и 290 нм.

	Фракция 0,15 М	Фракция 0,25 М
Концентрация при 270 нм, нг/мкл	0,185	0,071
Концентрация при 290 нм, нг/мкл	0,070	0,028
Содержание РНК, %	92	90

Проведенные расчеты свидетельствуют, что количество РНК в образцах, составляет 92% для фракции «0,15 М» и 90% для фракции «0,25 М». Нам не удалось показать 100% присутствия молекул РНК в обеих фракциях в двух экспериментальных повторах. Такой результат мог быть связан с двумя обстоятельствами. В первом случае не 100% содержание РНК молекул в образце могло быть связано с ошибкой вследствие малых объемов проб. Вторая возможность могла быть связана с тем, что во фракции «0,25 М» присутствуют молекулы ДНК. Для выявления

возможного присутствия ДНК в анализируемой фракции было проведено несколько серий экспериментов. Первоначально была предпринята попытка определить количество нуклеиновых кислот, сохранившееся в форме полимера после гидролиза слабой щелочью путем количественного осаждения изопропанолом. Были взяты две пробы нуклеиновых кислот из фракции «0,15 М» и фракции «0,25 М». Пробы были гидролизованы слабой щелочью. После гидролиза образцы нейтрализовали добавлением Tris-HCl (pH 7,5) и не деградированный материал ДНК осаждали равным объемом изопропанола из 0,3 М ацетата натрия (pH 5,2). Результаты эксперимента суммированы в **Таблице 3**.

Таблица 3. Результаты измерения нуклеиновых кислот на разных этапах гидролиза.

Фракция	Исходная концентрация нуклеиновых кислот, мг/мл	Общее количество нуклеиновых кислот в 50 мкл раствора, мкг	Концентрация нуклеиновых кислот в 10 мкл раствора после гидролиза NaOH осаждения и перевода в раствор, мг/мл	Общее количество нуклеиновых кислот, выделяемое после гидролиза NaOH, мкг	Процентное содержание нуклеиновых кислот, полученное после гидролиза NaOH, %
0,15 М	5,213	261	0,032	0,32	0,1
0,25 М	1,765	88	0,102	1,00	1,1

Оказалось, что фракция, смываемая 0,25 М PBS, содержит более 1% материала нуклеиновых кислот в полимерной форме. Что это могло значить? Во-первых, самое простое объяснение связано с контаминацией фракции двуцепочечной РНК молекулами ДНК. Во-вторых, фракция «0,25 М» могла содержать РНК/ДНК гибриды. В-третьих, при мягком химическом гидролизе могут сохраняться не деградированные двуцепочечные формы РНК.

Чтобы оценить присутствие ДНК были проведены эксперименты по качественному анализу образцов с использованием дифениламина и специфической цветной реакции на дезоксирибозу. 80 мг исходного препарата РНК гидролизовались 24 ч слабой щелочью. После гидролиза проводилось осаждение полимерной формы нуклеиновых кислот хлорной кислотой. Предполагалось, что если в 10 мг исходной РНК присутствует до ~10% двуцепочечной формы нуклеиновых кислот, а во фракции «0,25 М» присутствует 1% предположительно ДНК (что составляет 10 мкг), то при гидролизе большого количества исходного препарата РНК будет достигнут выход (предположительно ДНК) порядка 80-100 мкг, что будет давать уверенную цветную реакцию. Полученные результаты (**Рисунок 11**) свидетельствуют, что в препарате РНК, если и присутствуют остаточные ДНК, то их количество пренебрежительно мало, и, исходя из соображения «количества действующего вещества» принимать участие в радиопротекторном

действию не может. И, таким образом, можно полагать, что во фракции «0,25 М» присутствуют практически только молекулы двуцепочечной РНК.

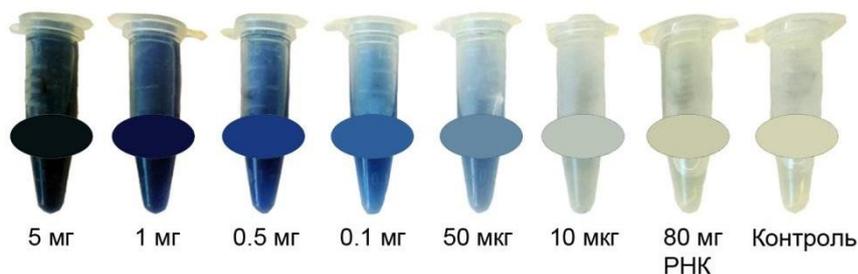


Рис. 11. Оценка содержания ДНК в препарате суммарной РНК дрожжей по цветной реакции Дише. На рисунке представлены результаты цветной реакции различных количеств (10 – 5000 мкг) препарата ДНК в сравнении с препаратом нуклеиновой кислоты, полученном после гидролиза 80 мг суммарной дрожжевой РНК. Вместе с цветными изображениями образцов после реакции Дише приведены цветовые гаммы шкалы понтонов.

3.4. Клонирование фрагментов двуцепочечной РНК фракции «0,25 М». Анализ нуклеотидных последовательностей полученных клонов

Является ли определяющей для осуществления радиопротекторного действия первичная структура молекул двуцепочечной РНК препарата РНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*?

Для ответа на этот вопрос было необходимо проанализировать первичную последовательность молекул РНК, выделяемой в двуцепочечной форме. Также было необходимо определить принадлежность составляющих двуцепочечных РНК фрагментов к генетическим локусам хромосом дрожжей. Установление типа нуклеиновых кислот фракции «0,25 М» как двуцепочечной РНК определило стратегию клонирования последовательностей РНК, входящих в состав фракции. Для получения кДНК с указанной РНК был использован подход, включающий DOP-ПЦР, синтез кДНК, амплификацию синтезированных кДНК, полировку концов с использованием Pfu полимеразы и клонирования затупленных фрагментов в плазмиду pBlueScript, гидролизованную рестриктазой EcoRV, дающей тупые концы. Были проведены два независимых раунда синтеза кДНК. В первом эксперименте размер кДНК и ПЦР фрагментов находился в пределах 10-110 п.н. Результатом второго синтеза были фрагменты размером 100-400 п.н. Образцы были объединены, и ДНК клонирована. В результате генноинженерных операций была получена библиотека из 43 клонов, которые были наработаны и секвенированы.

Последовательности были объединены в группы гомологий, которые представлены на **рисунке 12**. Происхождение найденных РНК находится в подписи к каждой группе гомологий. Секвенированные РНК молекулы в своем большинстве принадлежат к рибосомальным РНК или РНК, относящимся к белкам, ассоциированным с рибосомами *S. cerevisiae*. Приведенные данные предполагают, что для радиозащитного действия нуклеотидная последовательность фрагментов

РНК не имеет значения. Определяющим фактором является двуцепочечная структура фрагментов РНК.

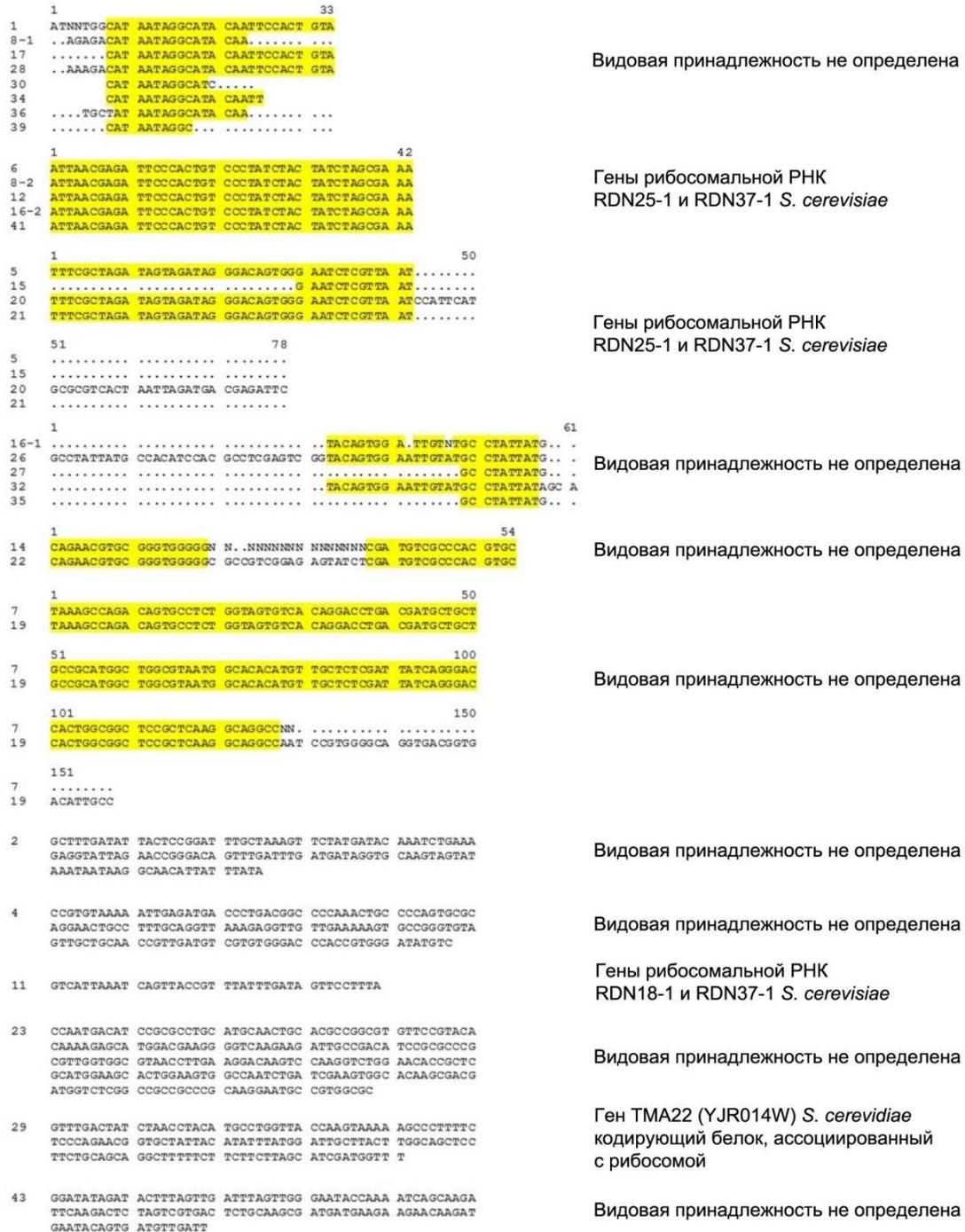


Рис. 12. Группы гомологий и видовая принадлежность секвенированных последовательностей.

Была проанализирована возможность секвенированных РНК образовывать шпилечные структуры. На рисунке 13 представлены формы двуцепочечных структур, формирующихся молекулами РНК секвенированных клонов. Для анализа были выбраны наиболее протяженные последовательности из каждой группы гомологий. Проведенный анализ свидетельствует, что все проанализированные последовательности могут формировать шпилечные структуры. Для

многих вариантов энергия образования шпилек (энергия Гибса) имеет высокое значение, что предполагает конкурентное, и в первую очередь, формирование таких структур в растворе препарата при медленном охлаждении денатурированного образца двуцепочечной РНК в ущерб восстановлению исходных двуцепочечных РНК молекул.

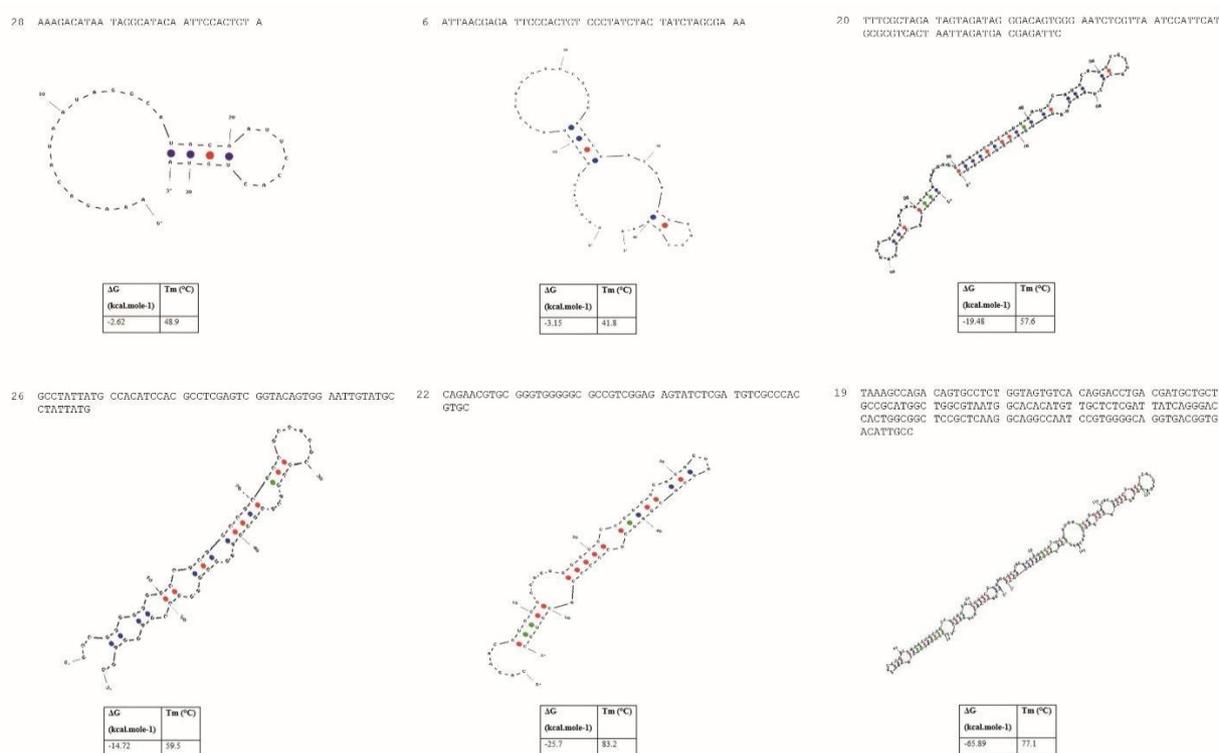


Рис. 13. Вторичная структура последовательностей клонов, принадлежащих к описанным группам гомологий. Для анализа вторичной структуры использовалась программа OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies, Inc.)

Факт возможности формирования шпилечных, закрытых с одной стороны, двуцепочечных структур РНК большого количества молекул дцРНК, содержащихся в препарате, ставил вопрос о том, какая из конформаций дцРНК обладает радиопротекторными свойствами.

3.5. Изменение радиозащитных свойств препарата РНК при «денатурации» и «ренатурации» и обработке РНКазой А в биологических тестах

При рехроматографии фракции 0,25 М на гидроксиапатите небольшое количество дцРНК (около 12%) элюируется 0,15 М PBS, что, по-видимому, является следствием частичной деградации РНК, а остальная дцРНК десорбируется с гидроксиапатита при 0,25 М PBS (**Рисунок 14А**). «Денатурация» препарата дцРНК (нагревание и быстрое охлаждение до 37°C с последующим ожиданием при +4°C в течение ночи) не изменяет ее хроматографический профиль (**Рисунок 14В**). «Ренатурация» (медленное, постепенное, в течение 45 минут охлаждение) приводит к тому, что 50% РНК десорбируется с гидроксиапатита при 0,15 М PBS (**Рисунок 14С**).

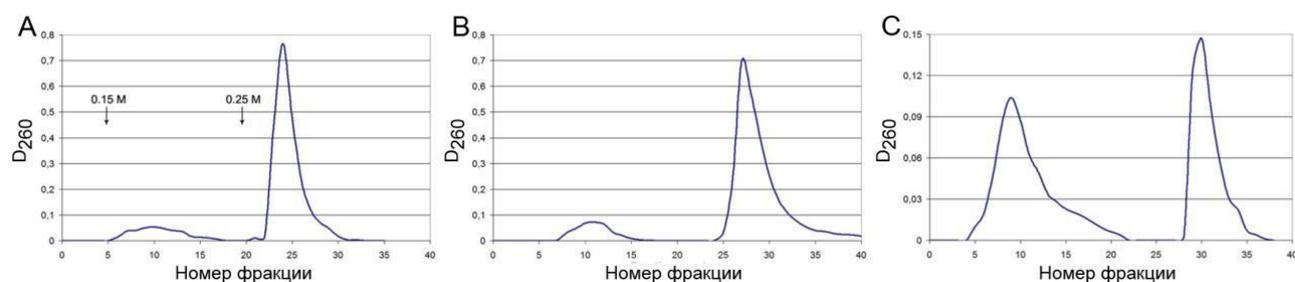


Рис. 14. Рехроматография двуцепочечной фракции РНК: А) без манипуляций, В) после ее «денатурации», С) после «ренатурации». «Денатурация» РНК: нагревание на водяной бане при 98°С 20 мин и быстрое (в течении 1-3 мин) охлаждение до 37°С последующим ожиданием перед введением животным при +4°С в течении ночи; «Ренатурация»: нагревание при 98°С 20 мин + 20 мин при 86°С и медленное (в течение 45 мин) охлаждение до 37°С.

Полученные в предыдущем разделе результаты по анализу возможных вторичных конформаций молекул РНК препарата дцРНК предполагали, что при «ренатурации» одноцепочечные молекулы РНК двуцепочечной фракции препарата суммарной РНК отжигаются внутренними гомологиями и формируют большое количество шпилечных структур с одноцепочечными участками (петлями), при этом не происходит отжига с гомологом.

Используя указанный подход, были оценены радиозащитные свойства «денатурированного» и «ренатурированного» препаратов суммарной РНК дрожжей.

Мышам линии СС57ВR за 40 мин до облучения внутрибрюшинно вводили препарат дрожжевой РНК. Процедуру «денатурации» и «ренатурации» проводили как описано выше. Наблюдались изменения в защитной эффективности препарата суммарной РНК: нагревание и быстрое охлаждение в указанном выше режиме не влияло на его радиозащитную эффективность, а нагревание и медленное охлаждение существенно ее снижало (**Рисунок 15**).

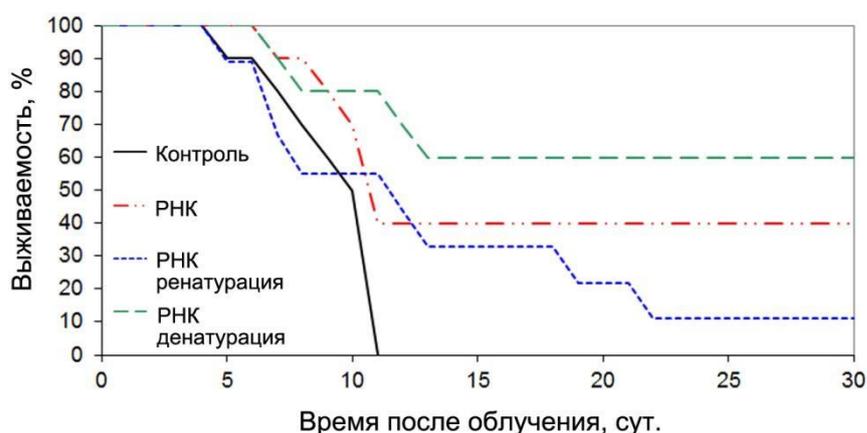


Рис. 15. Влияние «денатурации» и «ренатурации» суммарной дрожжевой РНК на ее радиозащитный эффект. Контроль (n=10); РНК (n=10); РНК ренатур. (n=9); РНК денатур. (n=10).

Обработка РНКазой А по время процедуры «денатурации» приводила к потере защитной эффективности препарата (**Рисунок 16**). После аналогичной процедуры, проводимой без

РНКаза, радиозащитный эффект оставался высоким. При обработке РНКазой А во время процедуры «ренатурации» радиозащитный эффект сохранялся.

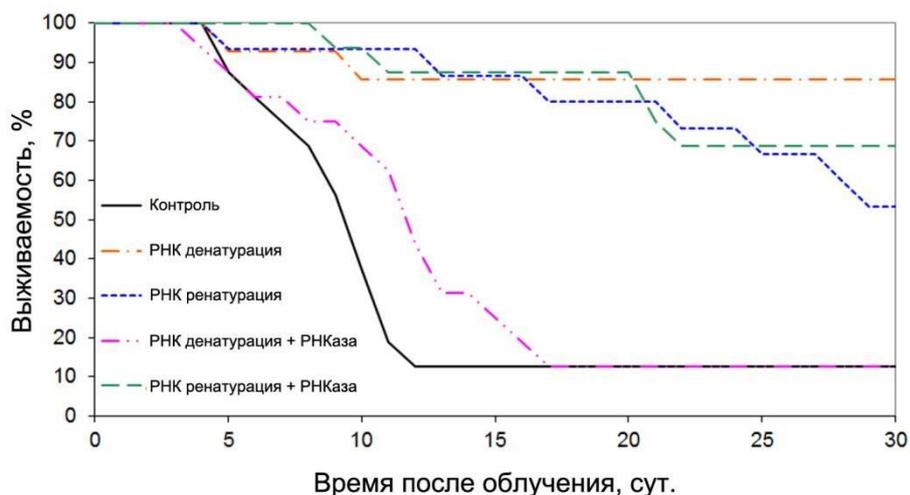


Рис. 16. Изменение радиозащитного действия двуцепочечной РНК при ее нагревании в присутствии панкреатической РНКазы и быстром или медленном последующем охлаждении. Контроль (n=16). Мышам групп 1-4 за 50 мин до γ -облучения (9,4 Гр при мощности 0,76 Гр/мин) введена суммарная РНК внутрибрюшинно по 10 мг/мышь после соответствующей процедуры: «Денатурация» – нагревание при 98°C 20 мин и быстрое охлаждение с последующим хранением при +4°C в течение ночи (n=15); «Ренатурация» – нагревание при 98°C 20 мин + 20 мин при 86°C и медленное (в течение 45 мин) охлаждение до 37°C (n=15). В двух группах за 5 мин до охлаждения в раствор РНК внесена панкреатическая РНКаза до концентрации 2 мкг/мл, после чего следовало быстрое охлаждение «Денатурация+РНКаза» (n=16) или медленное охлаждение «Ренатурация+РНКаза» (n=16). Представлены объединенные данные двух независимых экспериментов.

Предполагаются следующие события, происходящие с молекулами РНК в ходе описанных экспериментов (**Рисунок 17**). По-видимому, при «денатурации» денатурированные молекулы РНК в течении ночи находят своего гомолога, и структура, отвечающая за радиопротекцию восстанавливается. Обработка РНКазой А приводит к полному гидролизу одноцепочечных РНК молекул во время «ожидания» и полной потере препаратом радиозащитных свойств. Медленное охлаждение РНК приводит к формированию «схлопнутого» дуплекса той же молекулы. При этом образуется шпилька с замкнутым неспаренным участком на одном из концов молекулы. Такая форма по каким-то причинам теряет свои радиозащитные свойства. Обработка панкреатической РНКазой удаляет одноцепочечный неспаренный участок шпильки и двуцепочечная форма РНК со свободными двуцепочечными концами восстанавливается. Именно это событие, по-видимому, приводит к восстановлению радиопротекторных свойств такого образца РНК. Это означает, что для осуществления радиопротекторного действия требуется открытая с обеих концов двуцепочечная форма молекулы РНК.

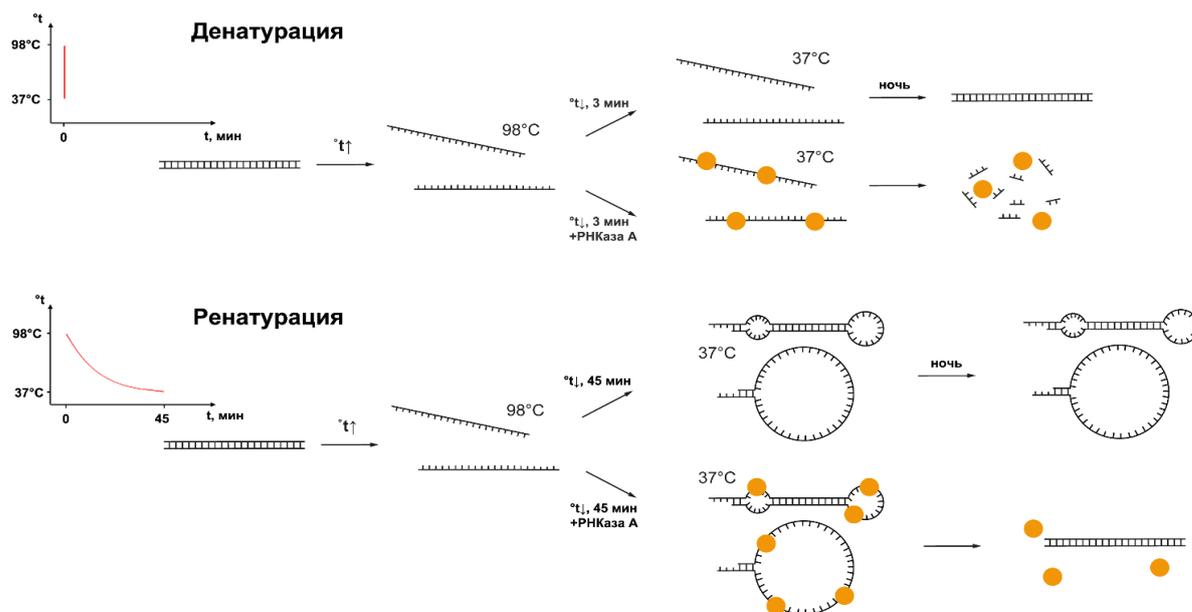


Рис. 17. Обобщенная схема формирования двуцепочечных молекул РНК после «денатурации» и «ренатурации» препарата РНК. Желтые кружки обозначают молекулы РНКазы.

3.6. Заключение по первой части исследования

Радиопротекторным действием обладает дцРНК, присутствующая как обособленная фракция в препарате суммарной РНК пекарских дрожжей *S. cerevisiae*. Для проявления радиозащитных свойств не имеет значение первичная последовательность молекул дцРНК. Определяющим фактором является двуцепочечная форма и открытая конформация двуцепочечных концов молекул.

Часть II. Поиск и характеристика клеточной мишени, воздействие на которую обуславливает радиозащитный эффект дцРНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae*. Модель радиопротекторного действия препарата дцРНК

Разработанный экспериментальный дизайн настоящей части исследования был основан на нескольких общих соображениях, вытекающих из проведенного анализа литературы и наших многочисленных пилотных экспериментов. Было сделано предположение, что радиозащитный эффект дцРНК определяется несколькими факторами, а именно:

1. Сохранением молекулы дцРНК в кровеносном русле в не деградированном состоянии.
2. Интернализацией дцРНК низкокодифференцированными эукариотическими клетками, включая ГСК, что сопровождается спасением гемопоэтических предшественников от γ -радиации, активацией их пролиферации и мобилизацией.

3. Фиксацией спасенных и распространяющихся кровотоком гемопоэтических предшественников в паренхиме селезенки с формированием герминативных центров пролиферации.

В результате указанных событий будет наблюдаться восстановление иммунной и кроветворной системы, и, как следствие, спасение летально облученных мышей.

3.7. Устойчивость молекул двуцепочечной РНК к деградации нуклеазами крови и их распределение по органам

Для проведения всех дальнейших работ была сконструирована искусственная молекула дцРНК, на 3'-концах которой была присоединена флуоресцентная метка 6-FAM. Структура синтетической молекулы была подобрана таким образом, чтобы возможность формирования двуцепочечных участков была минимальной (**Рисунок 18А**). Были синтезированы две комплементарные цепи РНК. Перед экспериментом необходимое количество материала комплементарных цепей, взятых в эквимольном количестве, отжигалось. Эффективность отжига проверялась по свечению с бромистым этидием (**Рисунок 18В**).

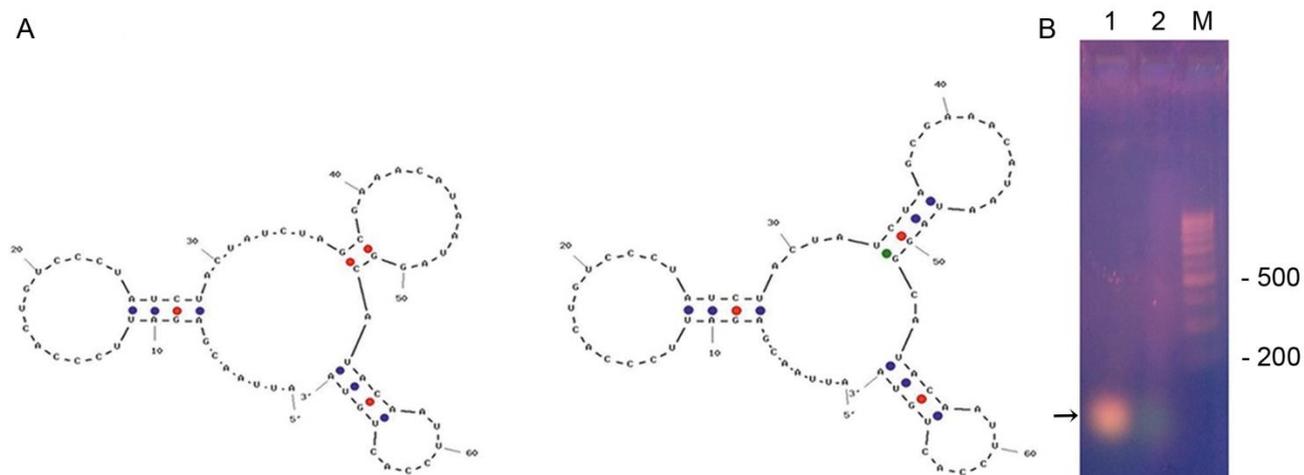


Рис. 18. Создание искусственной молекулы двуцепочечной РНК, несущей на 3'-конце FAM флуорохромную метку. А) Демонстрация возможных спаренных участков искусственной конструкции. В) Аннелированная синтетическая FAM-меченая двуцепочечная РНК (1) и нативная одноцепочечная FAM-меченая РНК (2) при электрофорезе в 1% агарозном геле. М – 100 бр.

Характеристика двуцепочечной РНК как активной субстанции, определяющей радиопротекторные свойства суммарного препарата дрожжевой РНК, ставила вопрос о ее сохранности в кровеносном русле как двуцепочечного полимера. Для проверки устойчивости молекул двуцепочечной РНК как полимерной молекулы в кровеносном русле была использована искусственная молекула двуцепочечной РНК, меченная с 3'-конца 6-FAM флуорохромом.

В первой серии экспериментов образец двуцепочечной РНК обрабатывался плазмой крови человека и мыши в конечном двукратном разведении плазмы. Образцы обрабатывались в течение часа при 20°C и 37°C. Было проведено несколько электрофоретических разгонок, необходимых

для демонстрации маркерных характеристик одноцепочечной и двуцепочечной РНК. Полученные результаты свидетельствовали, что молекулы двуцепочечной РНК устойчивы к действию нуклеаз крови. 60 минут инкубации в присутствии 0,5-кратной плазмы крови практически не влияет на электрофоретическую подвижность молекул образца двуцепочечной РНК. При этом происходит полная деградация одноцепочечных молекул (**Рисунок 19**).

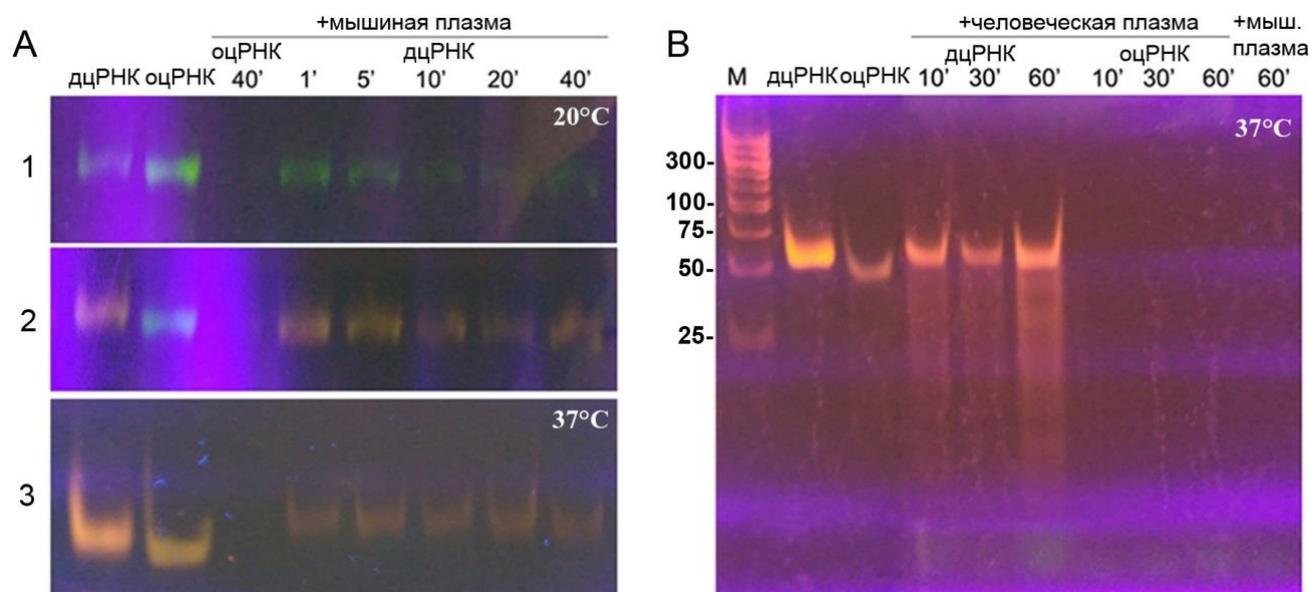


Рис. 19. Устойчивость молекул двуцепочечной РНК к деградации нуклеазами крови человека и мыши. Электрофоретический анализ препаратов двуцепочечной и одноцепочечной РНК, обработанных 0,5-кратной плазмой крови в течение различных промежутков времени при различных температурах. А) 1,2 – 20°C, плазма крови мыши, анализ свечения образцов без окраски (1) и после окрашивания интеркалирующим красителем этидием бромидом (2), 3 – 37°C, плазма крови мыши. В) 37°C, плазма крови человека и мыши (соответствующие дорожки отмечены на рисунке).

Во второй серии экспериментов дцРНК зонд был дополнительно мечен радиоактивным фосфором P^{32} и инфузироваан в кровотоки. Через час после инфузии образцы крови анализировали в агарозном гель-электрофорезе. Гель высушивали и ауторадиографировали. Результаты эксперимента приведены на рисунке 20А. Полученные результаты во второй серии экспериментов полностью подтвердили данные первого анализа. Показано, что радиоактивно меченый зонд не деградирует в кровеносном русле на протяжении как минимум одного часа экспозиции.

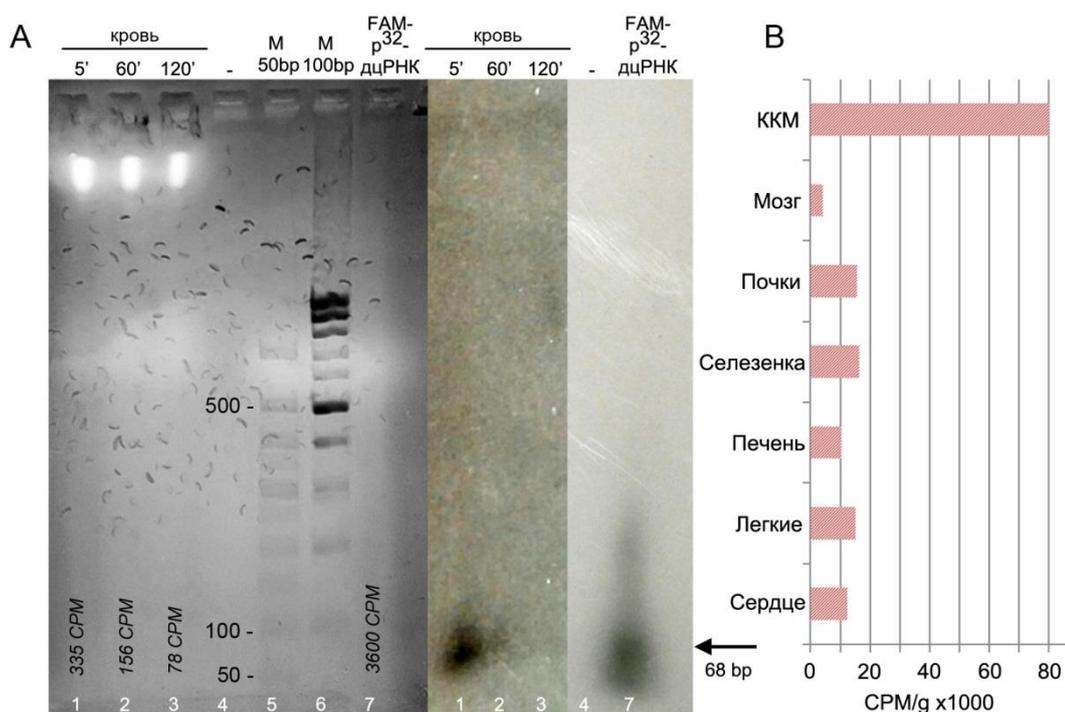


Рис. 20. Анализ устойчивости P³²-дцРНК зонда в крови и его распределение по органам мыши. А) Устойчивость радиоактивно меченого дцРНК зонда в кровеносном русле экспериментального животного. Сравнение электрофоретической подвижности P³²-меченого дцРНК зонда, выделенного из крови живой мыши через 5, 60 и 120 минут после его введения (агарозный электрофорез – слева, автордиограмма – справа). В) Распределение P³²-меченого материала в органах мыши через 3 часа после его внутривенного введения. Образцы органов были измерены на жидкостном сцинтилляционном счетчике «РАКБЕТА» (CPM – counts per minute). Значения нормированны относительно массы измеряемого органа.

Сохранение дцРНК зонда в кровеносном русле позволило оценить распределение P³²-меченого материала по органам экспериментальных животных. Показано, что радиоактивная метка, циркулирующая в кровотоке в составе дцРНК зонда, фиксируется преимущественно в костном мозге (**Рисунок 20В**).

3.8. C-kit низкодифференцированные гемопоэтические предшественники и мультипотентные прогениторы CD34⁺ мышей способны интернализировать FAM-меченый материал. Обработка клеток костного мозга искусственной дцРНК стимулирует колониеобразование гемопоэтическими предшественниками

Синтезированный отоженный зонд использовался для демонстрации доставки FAM-меченого материала в клетки костного мозга мыши.

Используя FAM-дцРНК, было показано, что клетки, интернализирующие меченый материал, детектируются в препарате костного мозга и обрамлены несколькими стромальными клетками, образующих с ней «розетку» (**Рисунок 21А**). Морфология розеток, сохранивших целостность после ресуспендирования костного мозга, может свидетельствовать, что FAM⁺ клетка находится в центре стволовой костномозговой ниши и принадлежит ей. Было установлено, что обработка костного мозга искусственной дцРНК индуцирует

колониобразование гемопоэтическими предшественниками. Наиболее чувствительным к обработке оказался гранулоцитарно-макрофагальный гемопоэтический росток (**Рисунок 21В, Таблица 4**). Проведенное типирование клеток костного мозга свидетельствует, что $C-kit^+$ низкодифференцированные клетки и $CD34^+$ ранние мультипотентные прогениторы одновременно FAM^+ (**Рисунок 21С, D**). Таким образом, было установлено, что, попав в костный мозг, дцРНК может интернализироваться ГСК. При этом она индуцирует пролиферацию гранулоцитарно-макрофагального ростка кроветворения.

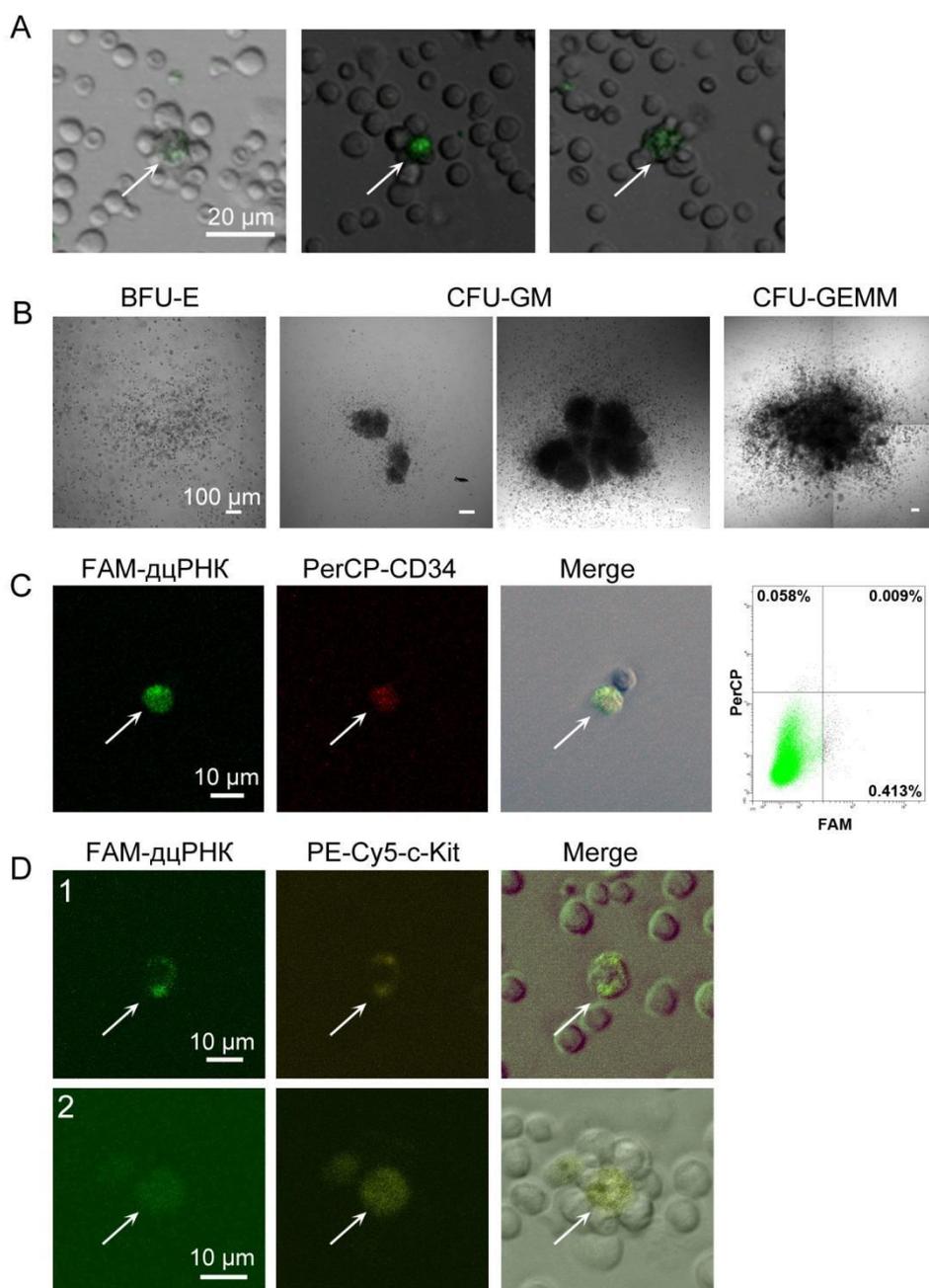


Рис. 21. Цитологический анализ клеток костного мозга как мишени воздействия дцРНК. А) Панель розеток, предположительно костномозговых стволовых ниш, после инкубации клеток с FAM-дцРНК. В центре розетки находится FAM^+ клетка. В) Морфология колоний, образованных гемопоэтическими прогениторами костного мозга после стимуляции искусственной дцРНК. С) Позитивная одновременно по двум маркерам $CD34^+/FAM^+$ клетка костного мозга. Клетки костного мозга обрабатывали препаратом FAM-дцРНК и PerCP-мечеными антителами к CD34 антигену, сортированные по $CD34^+$ клетки и анализировали на конфокальном микроскопе. Справа приведен плот проточной цитометрии,

демонстрирующий количественное содержание меченых клеток в препарате костного мозга. D) Клетки костного мозга после инкубации с FAM-дцРНК и антителами к с-Kit, одновременно позитивные по FAM (зеленым) и с-Kit маркерам (желтым). 1 – индивидуальная клетка; 2 – клетка в составе розетки, предположительно костномозговой стволовой ниши (всего **с-Kit+ клеток – 4,1%**, среди них **6,3% FAM+**).

Таблица 4. Количество колоний в соответствии с ростом кроветворения, давшим их развитие. Приведено среднее значение \pm стандартное отклонение.

Тип колонии	Контроль	дцРНК
BFU-E	13,5 \pm 0,7	9,5 \pm 0,7
CFU-GM	33,5\pm6,4	45,0\pm0,1
CFU-GEMM	2,5 \pm 0,7	2,0 \pm 1,4

3.9. Анализ количества и состояния форменных элементов крови у мышей, обработанных препаратами РНК и получивших сублетальную дозу γ -радиации 8 Гр

3.9.1. Характеристика формулы крови экспериментальных мышей в динамике на протяжении 37 суток наблюдения

Был проведен сравнительный анализ количества форменных элементов крови у мышей, подвергшихся дозе γ -радиации в 8 Гр. Выбор дозы облучения диктовался необходимостью оценки состояния форменных элементов крови у контрольных мышей на протяжении хотя бы 30 суток после облучения. При абсолютно летальном облучении (9,4 Гр) мыши гибнут на 14-17 сутки. За 60 мин до облучения животным внутривенно однократно вводили 7 мг суммарной РНК, 200 мкг или 400 мкг дцРНК. Контрольные животные получали инъекции физиологического раствора.

Показатели гибели животных после облучения дозой 8 Гр приведены на **Рисунке 22**. В группе животных, получавших суммарную РНК и 200 мкг дцРНК, выживаемость составила 100%. В группе мышей, получавших 400 мкг дцРНК, выживаемость составила 85,7%. В контрольной группе на 37 сутки после облучения выжили 40% мышей.

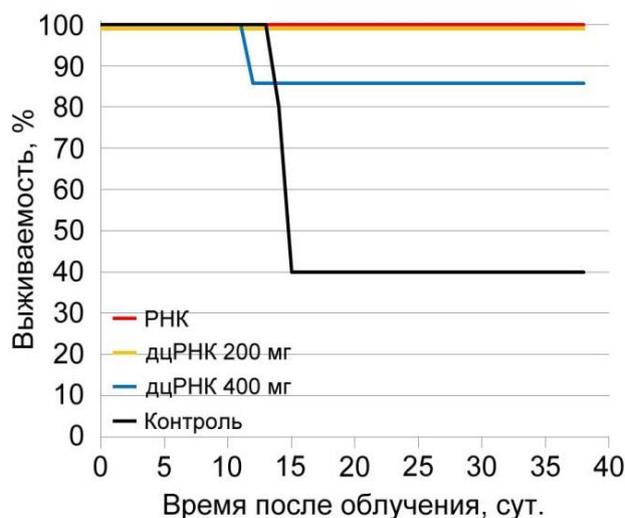


Рис. 22. Выживаемость животных в контрольной группе (n=5) и группах, получивших 7 мг суммарной РНК (n=10), 200 мкг или 400 мкг дцРНК (n=7) за 30 минут до облучения. $p < 0.05$.

Наиболее благоприятная картина восстановления состояния форменных элементов крови после облучения складывалась в группе, получившей суммарную РНК, что коррелирует со 100% выживаемостью животных в этой группе. В группе, получившей 200 мкг дцРНК, где также наблюдалась 100% выживаемость животных, были обнаружены более выраженные патологические особенности в морфологической картине форменных элементов крови по сравнению с группой, обработанной суммарной РНК (**Рисунок 23, Таблица 5**).

Показатели лейкоцитарной формулы претерпевали чрезвычайно резкие изменения. Для всех экспериментальных групп спустя сутки после облучения была характерна глубокая лейкопения (**Рисунок 23А**). В контрольной группе состояние полной потери лейкоцитов продолжалось до 12 суток. В группах, получивших суммарную РНК и дцРНК, количество лейкоцитов начинает восстанавливаться на 6-8 сутки после облучения. Во всех группах через 37 дней наблюдения общее количество лейкоцитов не вернулось к исходному уровню.

Через 2 суток после облучения наблюдалось падение количества лимфоцитов (**Рисунок 23В**). Далее в контрольной группе наблюдался резкий подъем количества лимфоцитов, который продолжался до 12 суток. После этого, начиная с 18 суток, началось последовательное падение количества лимфоцитов, которое сохранялось крайне низким до конца наблюдения. В экспериментальных группах снижение количества лимфоцитов наблюдалось на 18-20 сутки, далее до конца эксперимента происходило последовательное восстановление этой популяции клеток.

Во всех группах процент палочкоядерных нейтрофилов снижается до нуля в первые сутки после облучения (**Рисунок 23С**). В экспериментальных группах оно начинает восстанавливаться с 6 суток, сохраняется высоким до 22 суток, и возвращается к норме к концу наблюдения. В контроле резкое пикообразное увеличение нейтрофилов наблюдается только на 18 сутки, после чего также снижается до нормы к концу наблюдения.

Процент сегментоядерных нейтрофилов резко увеличилось через 2 суток после облучения во всех группах (**Рисунок 23D**). Выраженная нейтрофилия сохранилась до конца наблюдения.

Процент эозинофилов падает сразу после облучения и сохраняется низким до 8 суток наблюдения (**Рисунок 23Е**). В экспериментальных группах на 10-12 сутки количество эозинофилов резко возрастает. В группе, получавшей 200 мкг дцРНК, определяется локальное падение числа этого типа клеток на 18-20 сутки, после чего опять происходит резкое увеличение количества эозинофилов. В контрольной группе количество эозинофилов стало возрастать только на 22 сутки. К концу наблюдения во всех группах наблюдалась выраженная эозинофилия.

Во всех группах наблюдался ярко выраженный моноцитоз (**Рисунок 23F**). Процент моноцитов оставалось выше исходного уровня до конца наблюдения (37 сутки). Морфология моноцитов характеризовалась выраженными изменениями. У интактных животных преобладали

небольшого размера клетки с довольно правильной формой ядра. После облучения во всех группах возникали формы с огромными лопастными или сегментированными ядрами и большим размером ядра и всей клетки. Эти крупные формы ядер и крупные размеры клеток сохранялись вплоть до 37 суток наблюдения, причем на более поздних сроках появлялись крупноклеточные моноциты с крупными ядрами и с вакуолями в цитоплазме, по морфологии напоминающие макрофаги. В клетках моноцитов часто обнаруживались включения, напоминающие микроядра или структуры иной природы. В некоторых случаях можно было четко определить, что эти включения представляют собой фагоцитированные тромбоциты. Скопления тромбоцитов часто наблюдались возле моноцита, а в одном случае был замечен собственно процесс фагоцитоза.

Полученная картина восстановления лейкоцитов, в среднем к 8 суткам у экспериментальных групп, и длительная (до 18-20 суток) задержка восстановления лейкоцитов в контроле, коррелирует со временем летальных исходов, которое наблюдается на 14-15 сутки в группе контрольных мышей.

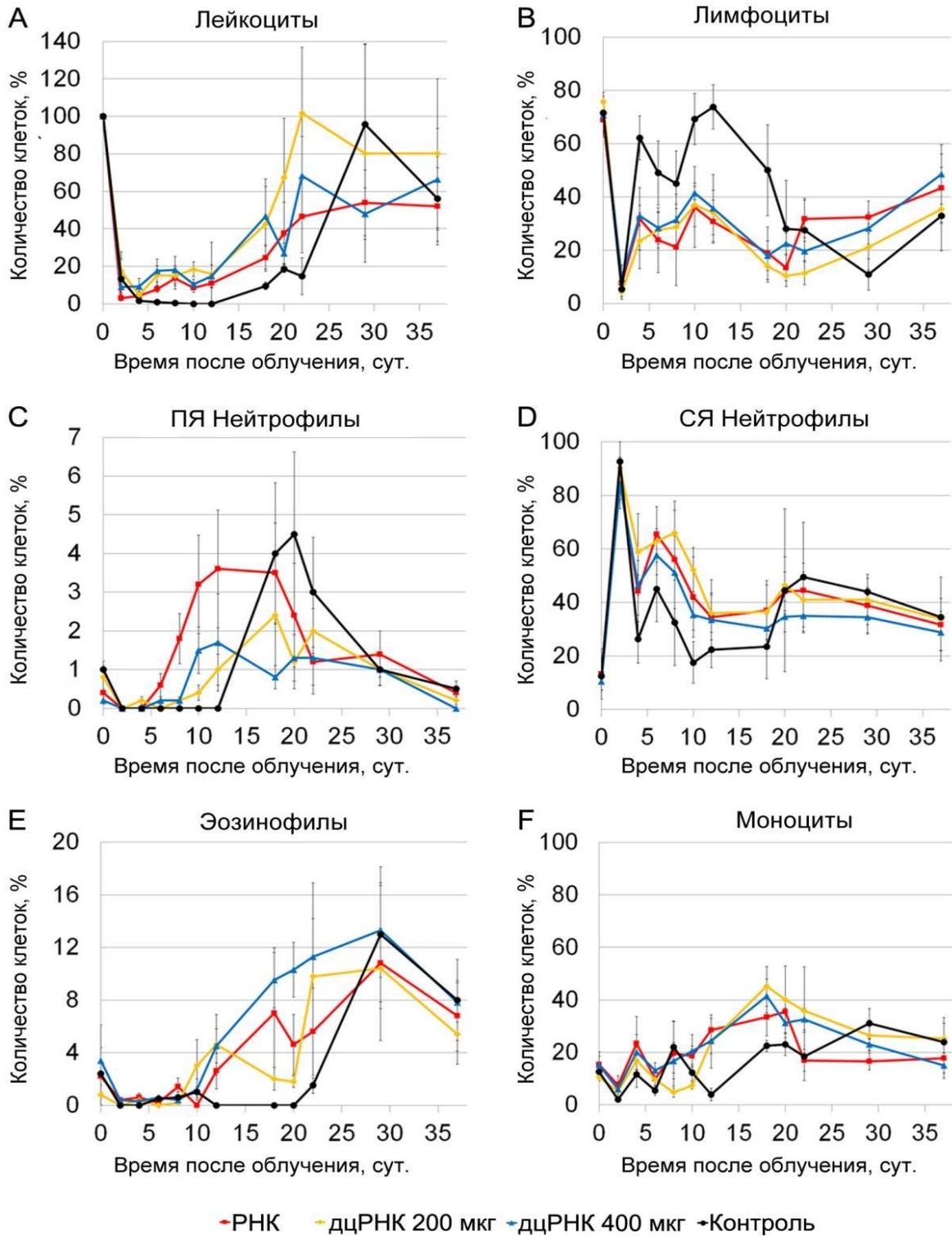


Рис. 23. Динамика содержания лейкоцитов, лимфоцитов, палочкоядерных (ПЯ) нейтрофилов, сегментоядерных (СЯ) нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов в контрольной группе и группах, получивших 7 мг суммарной РНК, 200 мкг или 400 мкг дцРНК за 30 минут до облучения (n=3).

Таблица 5. Гематологические показатели (%) у животных в контрольной группе и группах, получивших 7 мг суммарной РНК, 200 мкг или 400 мкг дцРНК за 60 минут до облучения.

Время после облучения, сутки		0	2	4	6	8	10	12	18	20	22	29	37	
7 мг суммарной РНК	лимфоциты	68,8	7,6	31,8	23,8	21,2	36,2	30,8	19,0	13,4	31,8	32,4	43,4	
	нейтрофилы	палочкоядерные	0,4	0	0	0,6	1,8	3,2	3,6	3,5	2,4	1,2	1,4	0,4
		сегментоядерные	13,2	84,4	44,2	65,4	56,0	42,0	34,4	37,0	44,0	44,4	38,8	31,6
		эозинофилы	2,2	0,4	0,6	0,2	1,4	0	2,6	7,0	4,6	5,6	10,8	6,8
моноциты	15,4	7,6	23,4	10,0	19,6	18,6	28,6	28,6	33,5	35,6	17,0	16,6	17,8	
200 мкг дцРНК	лимфоциты	75,8	4,4	23,6	27,5	28,8	37,0	34,2	14,0	10,4	11,4	21,2	35,4	
	нейтрофилы	палочкоядерные	0,8	0	0,2	0	0,2	0,4	1,0	2,4	1,2	2,0	1,0	0,2
		сегментоядерные	12,0	90,4	58,8	62,8	66,0	52,2	36,0	36,4	46,4	41,0	41,0	33,8
		эозинофилы	0,8	0	0,4	0	0,2	3,0	4,6	2,0	1,8	9,8	10,4	5,4
моноциты	10,6	5,2	17,0	9,7	4,8	7,4	24,2	45,2	40,2	35,8	26,4	25,2		
400 мкг дцРНК	лимфоциты	70,8	9,4	33,0	28,4	31,4	41,5	35,8	18,0	22,5	19,7	28,2	48,5	
	нейтрофилы	палочкоядерные	0,2	0	0	0,2	0,2	1,5	1,7	0,8	1,3	1,3	1,0	0
		сегментоядерные	10,4	84,2	46,5	57,6	51,2	35,3	33,5	30,2	34,7	35,0	34,5	28,7
		эозинофилы	3,4	0,4	0,3	0,6	0,4	1,2	4,5	9,5	10,3	11,3	13,3	7,8
моноциты	15,2	6,0	20,2	13,2	16,8	20,5	24,5	41,5	31,2	32,7	23,0	15,0		
Контроль	лимфоциты	71,6	5,4	62,2	49,0	45,0	69,2	73,8	50,0	28,0	27,5	11,0	33,0	
	нейтрофилы	палочкоядерные	1,0	0	0	0	0	0	0	4,0	4,5	3,0	1,0	0,5
		сегментоядерные	12,4	92,6	26,2	45,0	32,4	17,5	22,2	23,5	44,5	49,5	44,0	34,5
		эозинофилы	2,4	0	0	0,5	0,6	1,0	0	0	0	1,5	13,0	8,0
моноциты	12,6	2,0	11,6	5,5	22,0	12,3	4,0	22,5	23,0	18,5	31,0	24,0		

3.9.2. Патологические изменения морфологии клеток

3.9.2.1. Патологические изменения морфологии клеток белого ростка кроветворения

Рассмотрим морфологические особенности трех типов лейкоцитов крови (лимфоциты, нейтрофилы, моноциты) у животных разных групп на разных сроках после облучения.

Через сутки после облучения в мазках крови появлялись мононуклеары с зернистой и вакуолизированной цитоплазмой (**Рисунок 24-1, 2**). Зернистые мононуклеары, возможно, представляют собой фракцию натуральных киллеров, и увеличение их количества оправдано в связи с их функцией цитолиза поврежденных клеток, возникающих в большом количестве после облучения. В некоторых случаях зерна, обнаруживаемые в мононуклеарах, имели настолько крупные размеры, что были похожи на инородные включения в цитоплазме (**Рисунок 24-2**). Многие лимфоциты контактируют с околоклеточным дебрисом (**Рисунок 24-3**), также среди лимфоцитов появлялись нежизнеспособные клетки с широким бледным ободком цитоплазмы (**Рисунок 24-4**). Среди мононуклеаров характерной патологией являлось наличие клеток с выпячиваниями цитоплазмы и ядра (**Рисунок 24-5, 6**), отражающее процессы начальных стадий гибели этих клеток.

В первые сутки после облучения обнаруживались клетки с микроядрами, очень крупными микроядрами или псевдодвухядерные клетки (**Рисунок 24-7**). Имели место и собственно двухядерные лимфоциты (**Рисунок 24-8**). Пик появления микроядер приходится на 6-8 сутки, но клетки с микроядрами не исчезали в крови животных у всех наблюдаемых экспериментальных групп даже через месяц после облучения. Микроядра свидетельствуют о нарушении процесса митоза в облученных клетках, и появление их в большом количестве на ранних сроках после облучения не представляется удивительным. Тем не менее достаточно странно, что их небольшое количество сохраняется в течение длительного периода. Появляется гиперсегментированность и мелкосегментированность ядер нейтрофилов, доходящая до точечной фрагментации. Детектируется и необычная форма нейтрофилов (**Рисунок 24-9, 10**).

Обнаруживались двухядерные клетки с множеством включений, напоминающие клетки Лангханса или крупные макрофаги в гранулемах легких, для которых характерна сходная двухядерная морфология (**Рисунок 24-11**).

На поздних сроках (18 сутки) обнаруживали еще одну особенность. У лимфоцитов появляются клетки с неправильной формой ядра или расщеплением ядер (**Рисунок 24-12**). В это же время появляются в большом количестве эозинофилы со скудной зернистостью и нейтрофилы с нарушением сегментации, а именно, гипосегментацией ядер с образованием 2-3 крупных сегментов и необычной морфологией сегментации (**Рисунок 24-13, 14**).

Среди моноцитов также наблюдаются патологические морфологические изменения ядра. Появляются крупные клетки с очень крупными ядрами необычной, порой причудливой формы,

увеличивающей их поверхность (**Рисунок 24-15**). Также обнаруживались моноциты с признаками вакуолизации ядер, порой неотличимые от макрофагов, количество которых продолжало оставаться высоким до последних дней анализа, что является необычным фактом.

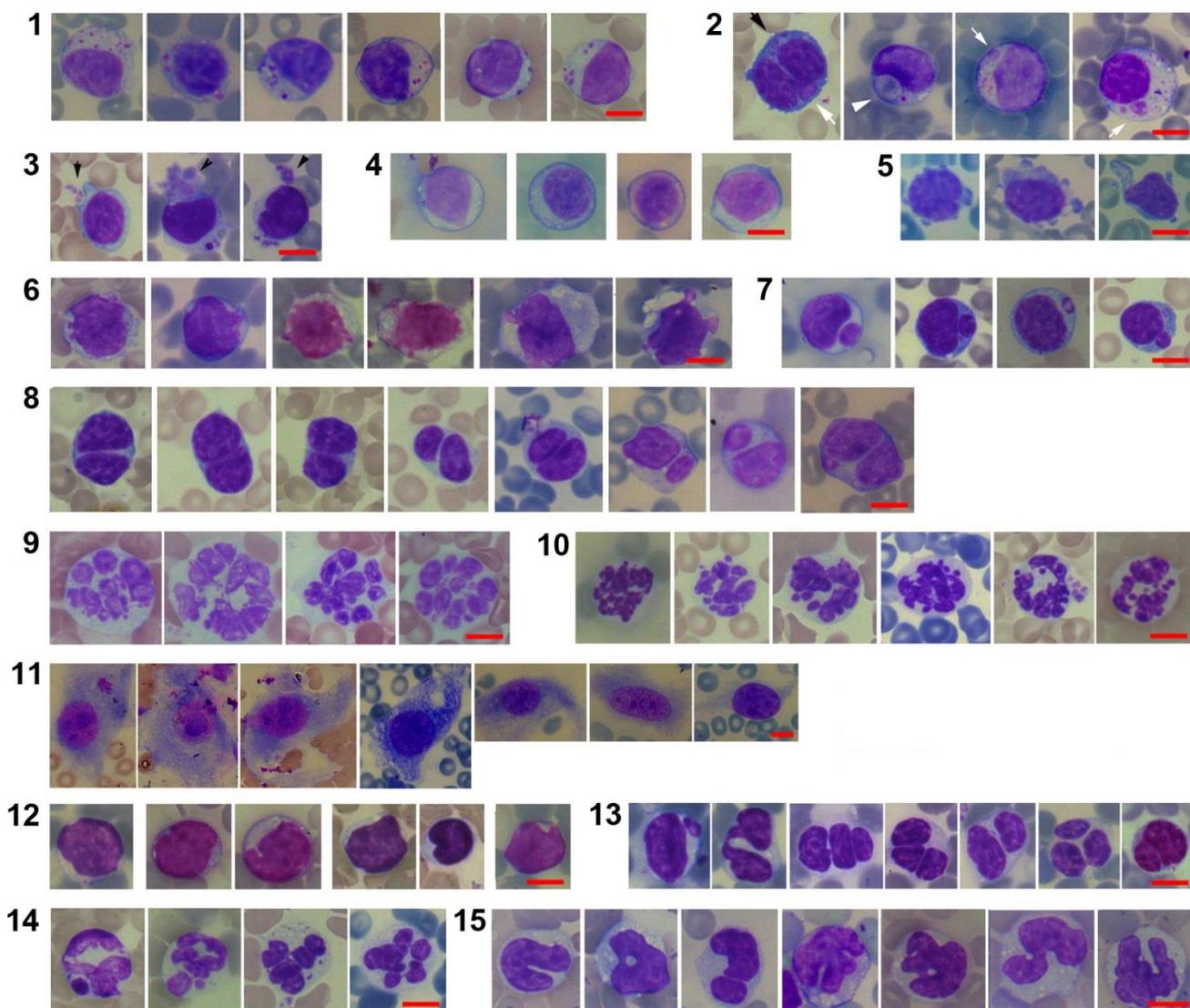


Рис. 24. Патологические изменения клеток белого роста кроветворения. 1 – зернистые лимфоциты, 2 – мононуклеары с включениями в цитоплазме (белые стрелки – крупные включения, черная стрелка – мелкие), 3 – лимфоциты в контакте с дебрисом, 4 – клетки с широким бледным ободком цитоплазмы, 5 – клетки с выпячиваниями цитоплазмы, 6 – клетки с выпячиваниями ядра, 7 – мононуклеары с микроядрами, 8 – двуядерные или почти двуядерные мононуклеары, 9 – гиперсегментация ядер у нейтрофилов, 10 – нейтрофилы с очень мелкими, пылевидными сегментами, 11 – двуядерные клетки с множеством включений, 12 – клетки с неправильной формой ядра или расщеплением ядер, 13 – гипосегментация ядер у нейтрофилов, 14 – нейтрофилы с причудливой сегментацией ядра, 15 – моноциты с различной формой ядра от простой до причудливой. Бары – 10 μm .

3.9.2.2. Апоптоз

Морфологическая картина крови животных сразу после облучения характеризуется значительным количеством апоптотирующих клеток (**Рисунок 25**). Особенно сильно это выражено в группе контрольных животных. В этой группе клетки с признаками апоптоза обнаруживались вплоть до 29 суток после облучения.

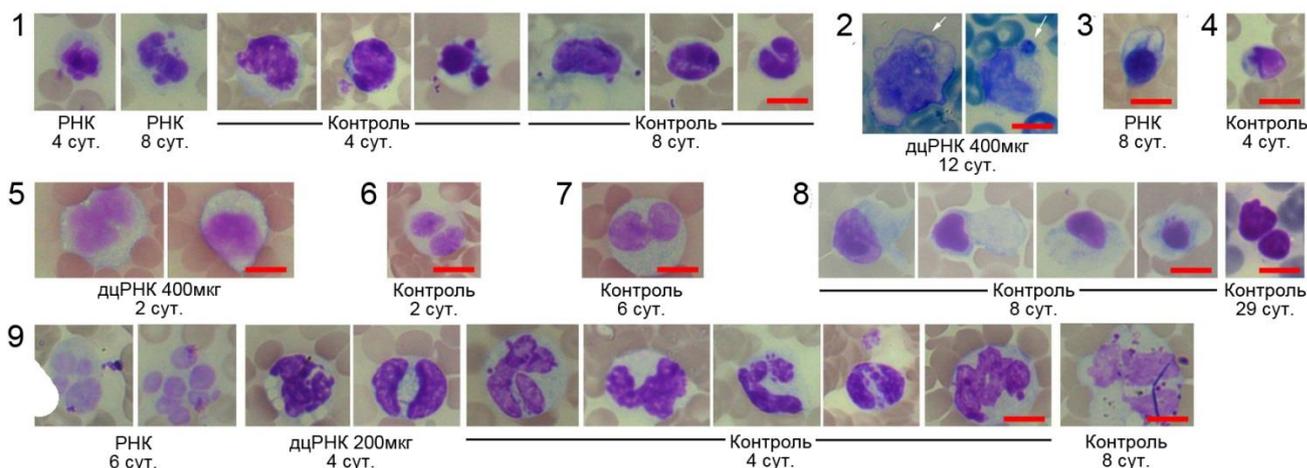


Рис. 25. Апоптотирующие клетки. 1 – лимфоциты с апоптозом, 2 – клетки с включениями (тонкая стрелка), 3 – деградирующий анизоцит, 4 – лимфоцит с апоптозом, 5 – моноциты с вакуолями в цитоплазме, 6 – моноцит с сегментированным ядром, 7 – моноцит с глыбообразными ядрами и признаками апоптоза, 8 – клетки с апоптозом, 9 – гранулоциты аномальные. Бары – 10 μм.

3.9.2.3. Патологические изменения общей морфологии клеток, нехарактерные для клеток крови

Одной из особенностей ранних наблюдаемых морфологических изменений клеток являлся анизоцитоз лимфоцитов (**Рисунок 26-1**). Анизоциты в значительных количествах появляются на 4 сутки в контрольной группе и группе, получившей суммарную РНК, но это явление характерно для всех групп и их можно обнаружить в крови у некоторых животных и через 20 дней после облучения.

С 4 суток в контрольной группе в крови появляются не характерные для нормальной крови клетки необычной формы, напоминающие ретикулярные. Это клетки веретеновидной формы, иногда достигающие огромных размеров (**Рисунок 26-2**). На 10 сутки были найдены необычные клетки очень большого размера, в 4-5 раз превосходящие размеры эритроцитов (**Рисунок 26-3**). Также обнаруживаются клетки очень крупного размера, которые морфологически трудно отнести к какому-либо классу клеток крови или костного мозга (**Рисунок 26-4**). Самым необычным явлением явилось обнаружение зрелого мегакариоцита в крови на 18 сутки после облучения у животного из группы, получившей 200 мкг дцРНК (**Рисунок 26-5**). Мегакариоцит – клетка-предшественник тромбоцитов, огромная клетка и ее местоположение – красный костный мозг. Из-за ее огромных размеров совершенно не понятно, как могла она оказаться в русле крови. В этой группе на более ранних сроках (10 и 12 суток после облучения) обнаруживались крупные клетки странного вида, похожие на ранние мегакариоциты.

Особенностью явилось то, что практически сразу после облучения (на 4-8 сутки) во всех исследуемых группах в крови появляются макрофаги очень крупных размеров с признаками их активного состояния (множественные вакуоли и остатки дегрирования в цитоплазме) (**Рисунок 26-6**). Если учесть, что все клетки крови претерпевают разрушение после облучения, возможно, это

явление спасает ткань от некротических масс. Макрофаги остаются в крови вплоть до 37 суток после облучения.

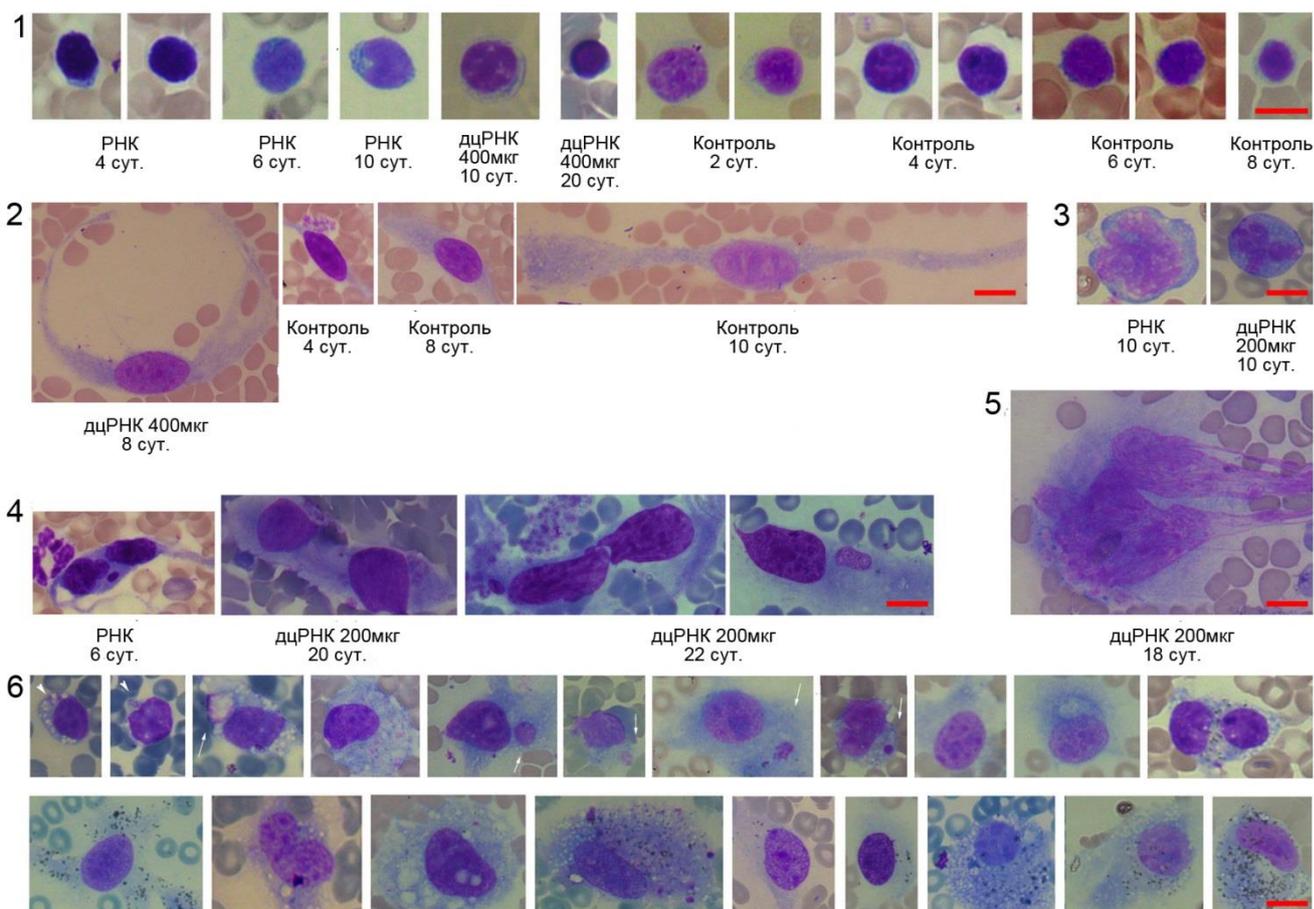


Рис. 26. Патологические изменения общей морфологии клеток, не характерные для крови клетки. 1 – анизоцитоз лимфоцитов, 2 – клетки веретеновидной формы, иногда достигающие огромных размеров, 3 – непонятные клетки крупных размеров, 4 – клетки очень крупного размера, которые морфологически трудно отнести к какому-либо классу клеток крови или костного мозга, 5 – мегакариоцит, 6 – макрофаги очень крупных размеров, с признаками активного состояния – множественными вакуолями и остатками дебриса в цитоплазме. Бары – 10 μм.

3.9.2.4. Патологические изменения морфологии клеток красного ростка кроветворения

Со стороны красной крови признаком восстановления эритроцитарного роста явилось появление в крови большого количества ретикулоцитов (**Рисунок 27-1**). Ранее всего (на 6 сутки) ретикулоциты появляются в мазке крови в группе, получившей суммарную РНК. В других экспериментальных группах ретикулоциты появились на 8 и 10 день для дозы 400 и 200 мкг дцРНК (**Рисунок 27-2**). Этот признак коррелирует с высокой выживаемостью животных, показанной для экспериментальных групп. В контрольной группе ретикулоциты появляются только на 18 сутки после облучения, то есть отставание процессов восстановления красной крови в контрольной группе составляет как минимум 10 дней.

В группах, получавших дцРНК, на позднем сроке после облучения появилась еще одна патологическая особенность крови – повышенная свертываемость, которая оценивалась

визуально по наличию сгустков тромбоцитарной массы и неравномерному распределению клеток крови в общей картине мазка (**Рисунок 27-3, 4**).

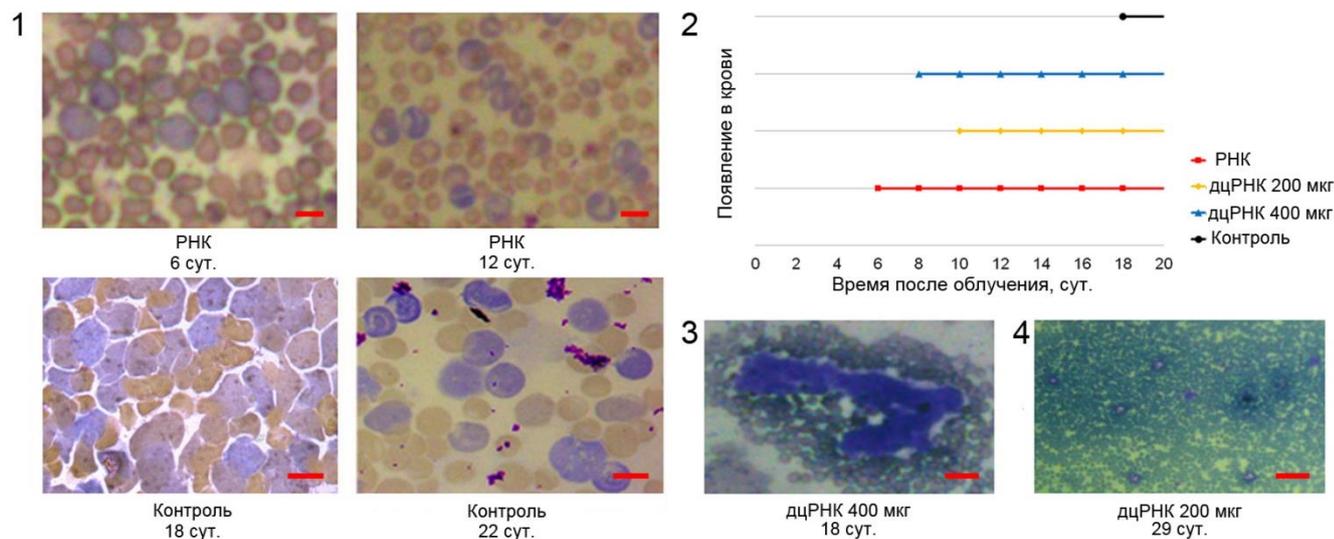


Рис. 27. Патологические изменения клеток красного ростка кроветворения. 1 – появление ретикулоцитов в крови (бары - 10μм), 2 – динамика количества ретикулоцитов, 3 – сгусток крови с тромбоцитами (бары - 30μм), 4 – сгустки крови (бары - 100μм).

3.9.2.5. Миело- и эритропоэз

Начиная с 10-12 суток обнаруживаются юные клетки-предшественники (**Рисунок 28**). Среди гранулоцитарного роста это миелоциты (возможно даже случаи промиелоцитов) и метамиелоциты (**Рисунок 28-1**). Пик палочкоядерных нейтрофилов приходится на 12-18 сутки после облучения в экспериментальных группах (**Рисунок 23, 28-2**). Появляются юные формы клеток эритроцитарного ряда, полихроматофильные и оксиофильные нормоциты (**Рисунок 28-3**), ранние лимфоциты (**Рисунок 28-4**), ранние эозинофилы (**Рисунок 28-5**). Среди моноцитов также наблюдали появление ранних форм (**Рисунок 28-6**). Кроме юных форм ростков крови появляются юные макрофаги, без вакуолей и дебриса в цитоплазме.

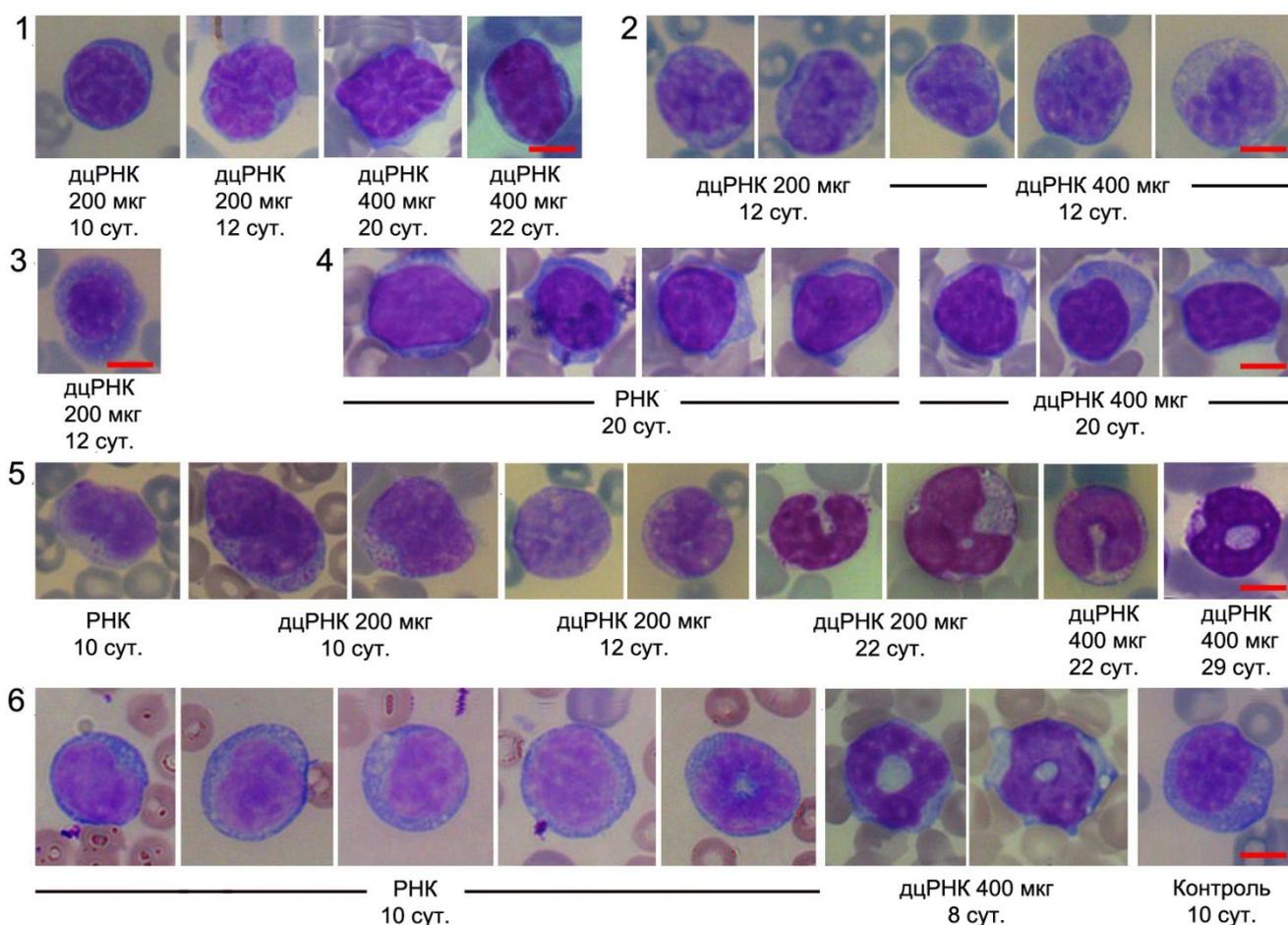


Рис. 28. Миело- и эритропоз. 1 – миелоциты и метамиелоциты, 2 – разные стадии созревания нейтрофилов, от ранних до палочкоядерных, 3 – оксифильный нормоцит, 4 – крупные лимфоциты с темной цитоплазмой, 5 – ранние эозинофилы, 6 – клетки с темной цитоплазмой и ядрами разной формы. Бары - 10µм

3.9.2.6. Оценка мутагенной активности дцРНК

Была оценена мутагенная активность дцРНК методом анализа хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей (**Таблица 6**).

Таблица 6. Количество клеток костного мозга мышей с хромосомными aberrациями в метафазах после однократного внутрибрюшинного введения дцРНК и в контрольной группе. Приведено процентное содержание клеток с нарушениями (%).

Группа	Фрагменты			Всего
	Одиночные	Двойные	Множественные	
дцРНК	2,75	0,5	1,25	4,5*
Контроль	1,5-2,0	0	0	1,5-2,0

* отличия от контроля достоверны с вероятностью $p < 0,01$.

Показано, что инъекции препарата РНК приводят к эффекту фрагментированности хромосом в митозе, что свидетельствует о мутагенной активности фрагментов дцРНК.

Характерной особенностью морфологии форменных элементов крови во всех группах были различные патологически изменения. У лимфоцитов были обнаружены многочисленные случаи появления микроядер в клетках. Среди лимфоцитов также наблюдалась и другая особенность, а именно зернистая цитоплазма. Зернистость цитоплазмы, обнаруженная в лимфоцитах сразу после облучения, сохранилась и на поздних сроках. Обнаружено много клеток с микроядрами или крупными зернами (гранулами) в цитоплазме, что характерно для натуральных киллеров. В группе, получившей 400 мкг дцРНК, на поздних сроках наблюдения обнаруживались выпячивания ядер и цитоплазмы у мононуклеаров. Среди гранулоцитов, начиная с ранних сроков, распространено явление гиперсегментации ядер, а на поздних сроках, гипосегментация ядер, напоминающая псевдопельгеровскую. Интересно отметить, что последнее явление имеет место при применении больными противовирусных препаратов или гранулоцитарного и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего факторов [Taegtmeier et al., 2005]. У эозинофильных гранулоцитов наблюдалось явление «скудной зернистости».

Во всех группах наблюдалось появление в крови клеток, не свойственных для данной ткани. Уже на 4 сутки после облучения во всех исследуемых группах появляются макрофаги. По-видимому, они приходят из окружающих тканей, они содержат очень много вакуолей и иногда дебрис. На более поздних сроках начинают появляться и другие необычные клетки, веретенообразные, типа ретикулярных из костного мозга; клетки напоминающие клетки Ланггантса из гранулем легких; а также клетки, размер которых превышает размеры эритроцитов в 7-13 раз. Кроме того, на поздних сроках обнаруживаются клетки, похожие на макрофаги без вакуолей. Все эти необычные клетки не исчезали даже спустя 37 суток после облучения.

В процессе анализа морфологической картины клеток в крови животных, получавших дцРНК, обнаруживалось присутствие ранних форм созревания всех трех типов лейкоцитов – лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. В мазках крови, начиная с 8 суток и далее, обнаруживались в ряду гранулоцитов клетки типа метамиелоцитов, а затем миелоцитов и промиелоцитов. В некоторых группах попадались клетки, похожие на бластные формы. Ранние формы типа миелоцитов и метамиелоцитов присутствовали в мазках крови даже на 37 сутки после облучения. Все указанные формы клеток, как правило, присутствуют в костном мозге и в кровь обычно попадают только метамиелоциты и палочкоядерные гранулоциты. Такое явление может свидетельствовать о бесконтрольном росте гранулоцитарного ростка, по-видимому, в результате его чрезмерной активации. В группе, получившей суммарную РНК, ранние стадии гранулоцитарного ряда также были замечены на некоторых сроках наблюдения.

В группах, получивших инъекции дцРНК, на поздних сроках проявлялась повышенная свертываемость крови, о чем говорили массовые скопления тромбоцитарных масс в мазке.

Общая картина радиозащитного действия дцРНК от воздействия летальных доз радиации связана со спасением и быстрым восстановлением всех трех ростков белой крови и эритроидных прогениторов. Характерным является длительное сохранение напряженного пролиферативного состояния, как белого, так и красного ростков кроветворения. Также характерным является тот факт, что, несмотря на уверенный радиозащитный эффект, клетки крови претерпевают явно выраженные патологические изменения.

3.10. Определение критического органа хоуминга FАM+ ГСК

В настоящем разделе исследования была предпринята попытка в прямом эксперименте ответить на вопрос, могут ли ГСК после летального облучения и мобилизации фиксироваться в паренхиме селезенки и давать селезеночные колонии, что наблюдается всегда при соответствующих обработках. Интегрированный материал предыдущих разделов свидетельствует, что примитивные гемопоэтические прогениторы и мультипотентные клетки крови интернализуют FАM- γ P³²-дцРНК. То есть, обработав клетки костного мозга радиоактивно меченой дцРНК, меченый дцРНК зонд будет локализован только в этом типе клеток и при реинфузии образца клеток костного мозга, содержащего меченые гемопоэтические предшественники, можно отследить хоуминг радиоактивно меченых ГСК. Известно, что после мобилизации ГСК циркулируют в кровеносном русле около 2 часов [Höfer and Rodewald, 2018; Pinho and Frenette, 2019; Choi, Mahadik and Harley, 2015].

Клетки костного мозга вымывали из бедренных костей мышей, метили FАM- γ P³²-дцРНК, отмывали от не включившегося материала, контролируя процесс счетчиком Гейгера и реинфузировали реципиентным мышам. Через 3 часа животных забивали, органы препарировали и считали радиоактивность на счетчике RackBetta. Расчет велся на грамм массы органа [Boggs, 1984]. Были проведены две серии экспериментов. С использованием нативных животных и животных в состоянии глубокой лейкопении после обработки цитостатиком циклофосфамидом [Likhacheva et al., 2007 a]. Цитостатик циклофосфамид, подобно γ -радиации, опустошает кроветворные органы, что дает возможность, используя радиоактивно меченые гемопоэтические предшественники, отследить критические органы, в которых ГСК преимущественно фиксируются. Известно, что в первую очередь циторедукция наблюдается в костном мозге и селезенке. Полученные результаты свидетельствуют, что критическими органами для ГСК, циркулирующих в кровеносном русле в случае нативных мышей, являются костный мозг и селезенка (**Рисунок 29А**). В случае обработки циклофосфамидом фиксация радиоактивно меченых клеток наблюдается дополнительно в легких (**Рисунок 29В**).

На начальных этапах этой части исследования было показано, что дцРНК не деградирует как в плазме крови мышей [Ritter et al., 2022], так и непосредственно в кровеносном русле, где

она детектируется как нативная дцРНК на протяжении не менее 1 часа. То есть можно ожидать, что в результате инъекций дцРНК перед γ -облучением молекулы дцРНК будут сохраняться в кровеносном русле и интернализироваться в ГСК. Спасенные от разрушения радиацией ГСК, после мобилизации, возвращаются в костный мозг и фиксируются в селезенке, давая развитие селезеночным колониям, что неоднократно было показано в наших экспериментах.

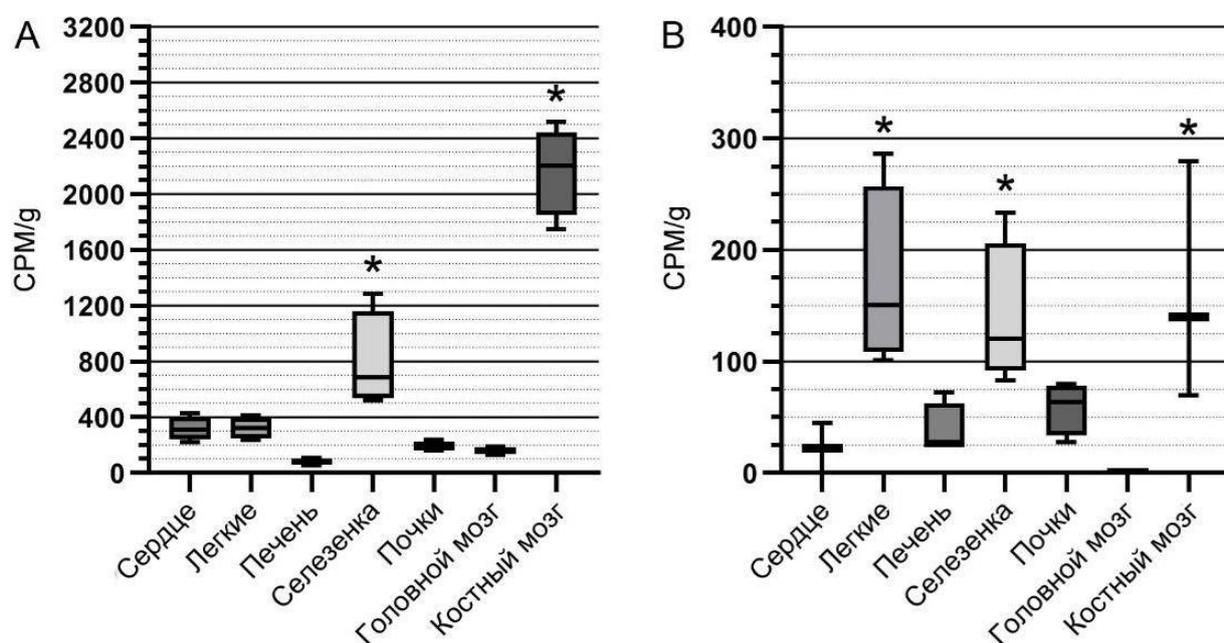


Рис. 29. Хоуминг радиоактивно меченых FAM- γ ^{P32}-дцРНК клеток костного мозга у (А) нативных мышей и (В) мышей с индуцированной циклофосфамидом лейкопенией (n=4, * p<0.05).

3.11. Анализ развития селезеночных колоний после проведенного летального облучения

Анализ состояния экспериментальных животных, выживших после летальных доз γ -радиации в отдаленные сроки после проведенного облучения, свидетельствовал о значительных нарушениях в клетках, формирующих кожный покров мышей. В течение 50-150 дней после обработки мыши прогрессивно седали (**Рисунок 30А**). Анализ развития селезеночных колоний на 9-12 сутки после облучения указывает на то, что главной мишенью воздействия препарата РНК являлись ГСК. В селезенках мышей, обработанных до облучения препаратом РНК, наблюдалось от 27-42 лейкоцитарных колоний на селезенку, в контрольных селезенках – в среднем меньше 1 колонии. Можно предположить, что спасенные от разрушения ионизирующим облучением гемопоэтические предшественники способны выходить в кровоток и заселять опустошенные вследствие обработки радиацией иммунокомпетентные органы, например, селезенку.

В результате мобилизации спасенных стволовых клеток крови в белой пульпе селезенки формируются селезеночные колонии, из которых развивается новая иммунная и кроветворная системы организма взамен разрушенных радиацией (**Рисунок 30В**).

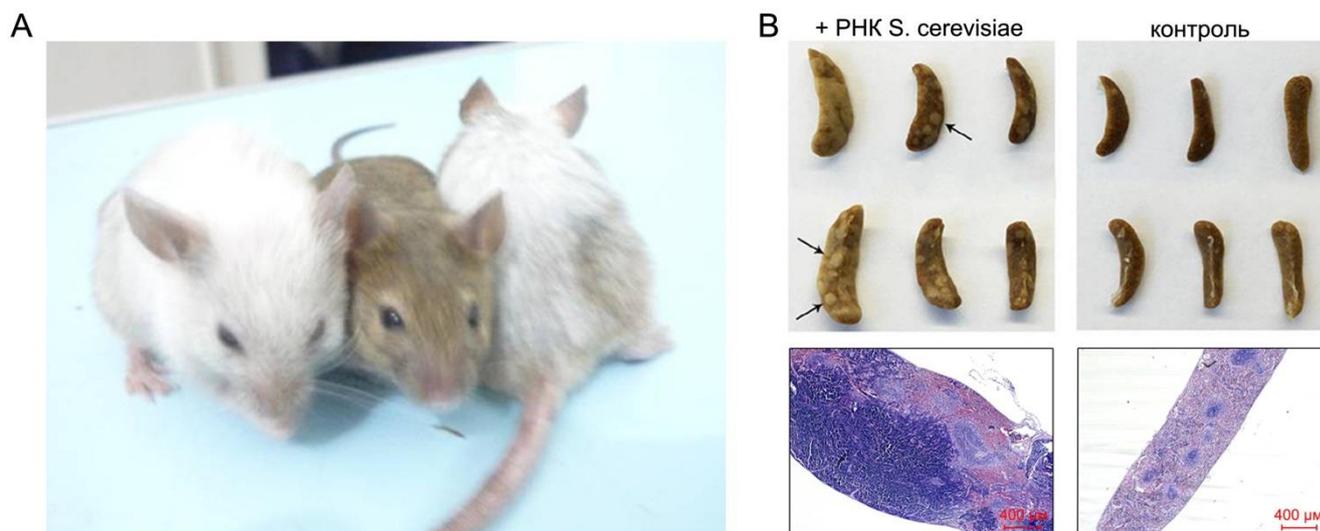


Рис. 30. А) Фенотипическое сравнение мыши, подверженной обработке высокодозовым ионизирующим облучением (слева и справа), и интактной мыши (в центре). Экспериментальные животные представлены на 150 сутки после облучения. В) Селезеночные колонии, сформированные у животных, обработанных препаратом дрожжевой РНК, и у контрольных животных. Стрелками указаны лейкоцитарные колонии, являющиеся показателем выживаемости экспериментальных мышей. В группе после введения РНК наблюдалось в среднем более 27 колоний на селезенку, в контрольной группе – в среднем меньше 1 колонии на селезенку. Ниже приведены гистологические препараты селезенки окрашенных гематоксилин-эозином.

3.12. Заключение по второй части исследования

Проведенный разноплановый анализ предполагает, что основной мишенью радиопротекторного действия препарата дцРНК является ГСК и ее ранние мультипотентные прогениторы. Молекулы дцРНК, взаимодействуя с с-Kit/CD34 клетками костного мозга, индуцируют их пролиферацию и колониобразование. При этом FAM-меченый материал дцРНК зонда локализуется во внутренних компартментах ГСК. Наиболее выражено на стимуляцию дцРНК отвечает гранулоцитарно-макрофагальный росток кроветворения. В крови мышей, обработанных до облучения препаратом РНК, на 10 сутки в крови регистрируются ранние костномозговые предшественники, что свидетельствует о мобилизации стволовых клеток. Характерным является длительное сохранение напряженного пролиферативного состояния, как белого, так и красного ростков кроветворения. Вместе с этим в селезенке обработанных дцРНК и облученных мышей детектируется высокое (до 42 шт.) содержание селезеночных колоний, которые являются герминативными центрами, образованными спасенными мобилизованными в кровотоке и фиксированными в паренхиме селезенки ГСК.

На основе результатов проведенных исследований, были сформулированы **основные положения модели радиопротекторного действия препарата дцРНК:**

1. Молекулы дцРНК не деградируют в кровеносном русле.
2. Молекулы дцРНК интернализируются низкодифференцированными эукариотическими клетками, включая ГСК. Интернализация фрагментов дцРНК во внутренние компартменты

ГСК сопровождается спасением гемопоэтических предшественников от γ -радиации, активацией пролиферации и мобилизацией спасенных стволовых клеток.

3. Сохранившие жизнеспособность мобилизованные гемопоэтические предшественники фиксируются в паренхиме селезенки, где формируют герминативные центры пролиферации. Происходит восстановление иммунной и кроветворной системы облученных мышей и, как следствие, спасение мышей от гибели.

Часть III. Доказательство интернализации фрагментов дцРНК в эукариотическую клетку. Экстраполяция данных на ГСК

3.13. Сравнительный анализ интернализации FAM-дцРНК и TAMRA-дцДНК в CD34+ клетки Кребс-2

В наших исследованиях на протяжении многих лет используется стандартизированный дцДНК зонд – TAMRA ПЦР меченый *AluI* фрагмент человека. Показано, что TAMRA-дцДНК интернализуется незначительной (0,1-3,0%) популяцией низкодифференцированных клеток различных типов клеточных сообществ (мезенхимальные стволовые клетки, CD34+ стволовые клетки крови и клетки опухолей различного генеза, включая асцитную форму карциномы мышей Кребс-2) [Dolgova et al., 2014; Potter et al., 2016, 2017; Ritter et al., 2022]. Дополнительно было обнаружено, что TAMRA+ клетки Кребс-2 одновременно несут поверхностный маркер стволовых клеток крови CD34. 95% TAMRA+ клеток в тоже время являются CD34+. При этом только половина CD34+ клеток способны захватывать TAMRA-дцДНК [Dolgova et al., 2014].

Во второй части настоящей работы установлено, что FAM-меченый материал, входящий в состав дцРНК зонда, детектируется в c-Kit/CD34+ низкодифференцированных клетках крови. При анализе c-Kit+/CD34+/FAM+ клеток было обнаружено, что их количество составляет всего 0,01% - 0,1% клеток костного мозга. Этот факт ограничивал возможность анализа механизма интернализации фрагментов дцРНК в гемопоэтические клетки-предшественники на модели ГСК.

Принимая во внимание вышеизложенное, было сделано предположение, что CD34+ клетки Кребс-2 вместе со способностью к интернализации фрагментов дцДНК обладают способностью интернализировать фрагменты дцРНК. Была проведена серия экспериментов, результаты которых свидетельствуют, что CD34+ клетки Кребс-2 способны интернализировать FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда. Первичный анализ свидетельствовал, что FAM флуорохром не интернализуется клетками асцита Кребс-2. Также ранее было показано, что трифосфат, меченый флуорохромом, также не интернализуется в клетки Кребс-2 [Dolgova et al., 2014]. Предположительно, в клетках асцита Кребс-2 детектируется полимерная форма дцРНК, несущая флуоресцентную метку (**Рисунок 31**).

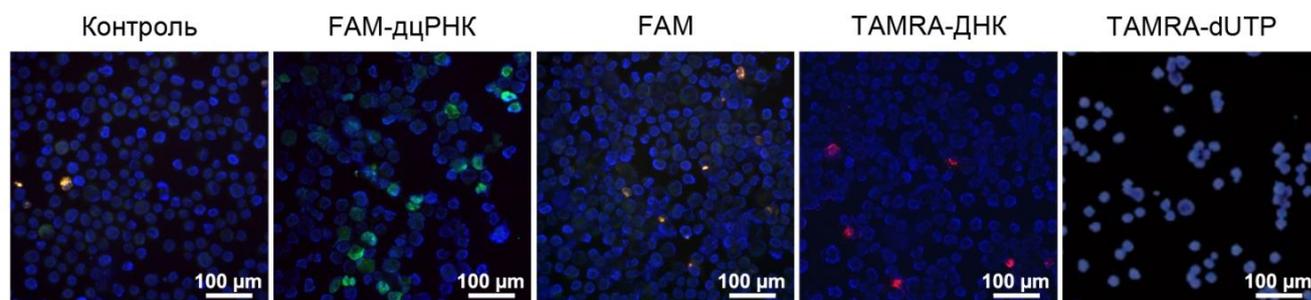


Рис. 31. Клетки Кребс-2, обработанные FAM-дцРНК, FAM, TAMRA-дцРНК, TAMRA-dUTP.

Многokратно показано, что в различных препаратах асцита Кребс-2 присутствует от 0,1% до 11% клеток, которые позитивны по FAM-меченому материалу в составе дцРНК зонда и TAMRA-дцДНК. Ниже приводятся сравнительные данные трех конкретных экспериментов по способности клеток Кребс-2 интернализировать FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда и TAMRA-дцДНК.

При использовании TAMRA-дцДНК обнаружено, что в асците Кребс-2 содержится 0,3% CD34+ клеток, 8,1% TAMRA+ клеток, 0,3% CD34+/TAMRA+ клеток (**Рисунок 32А**). При использовании FAM-дцРНК в асците Кребс-2 получено следующее процентное распределение: 1,7% CD34+ клеток, 1,8% FAM+ клеток, 0,8% CD34+/FAM+ клеток (**Рисунок 32В**).

Были проведены эксперименты по анализу совместной локализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда и TAMRA-дцДНК в клетках асцита Кребс-2. Установлено, что 2,1% клеток одновременно позитивны по обоим маркерам. При этом 0,7% клеток асцита интернализируют только FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, а 2,0% клеток интернализируют только TAMRA-дцДНК (**Рисунок 32С**). Полученный результат предполагал, что существуют как общие закономерности интернализации обоих типов нуклеиновых кислот в клетки асцита Кребс-2, так и возможность существования независимых путей проникновения во внутренние компартменты потенциальных к интернализации клеток.

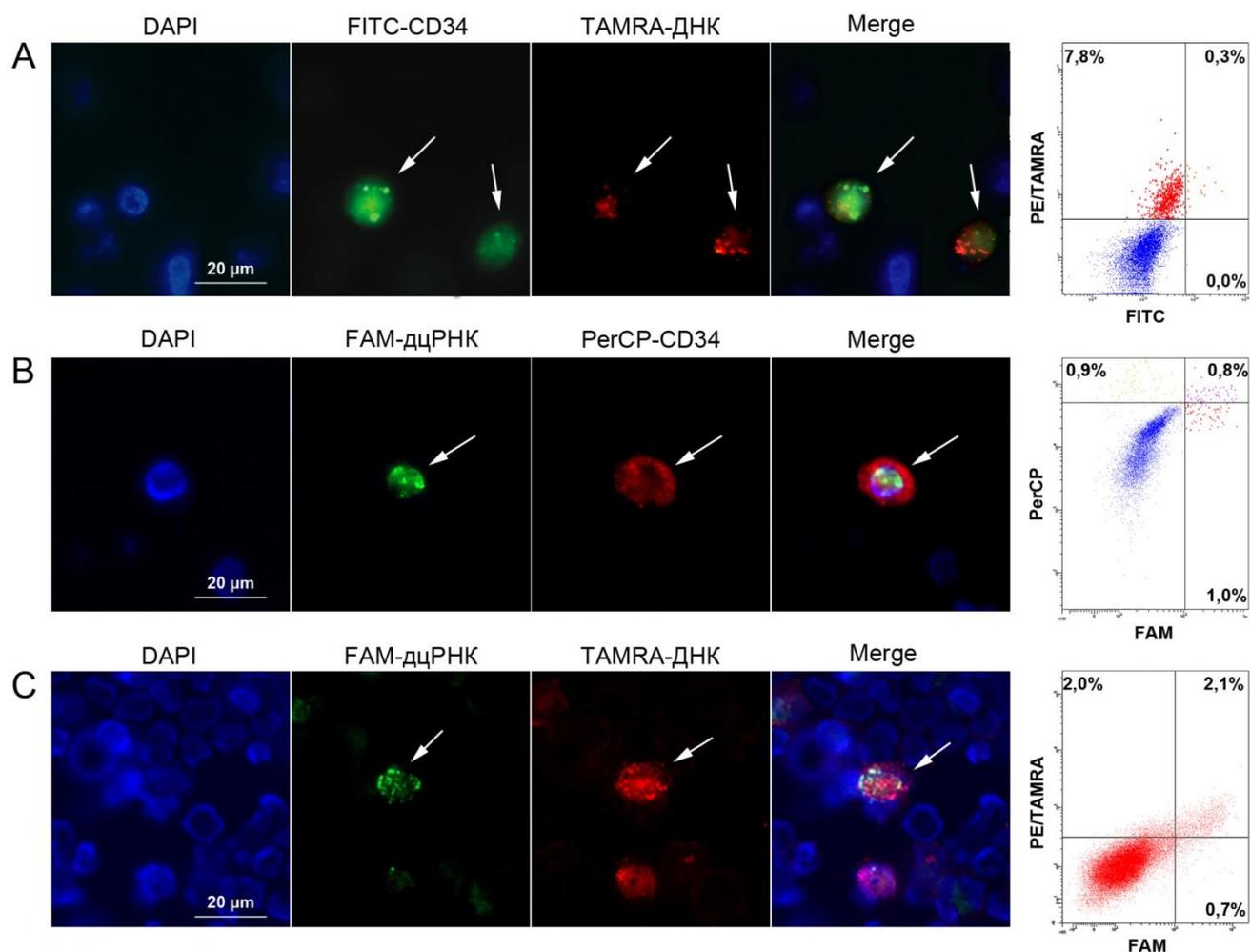


Рис. 32. Цитологический анализ интернализации фрагментов FAM-дцРНК и TAMRA-дцДНК в CD34+ клетки Кребс-2. Клетки Кребс-2 были обработаны: А) FITC-мечеными антителами к CD34 (зеленый) и TAMRA-дцДНК (красный). В) FAM-дцРНК (зеленый) и PerCP-мечеными антителами к CD34 (красный). С) FAM-дцРНК (зеленый) и TAMRA-дцДНК (красный). Справа соответственно приведены результаты проточной цитометрии препаратов обработанных клеток.

Для понимания взаимоотношений TAMRA-дцДНК и FAM-дцРНК при взаимодействии с клетками Кребс-2 и понимания дальнейших направлений исследований были проведены эксперименты по перекрестному конкурентному ингибированию интернализации меченых TAMRA-дцДНК и FAM-дцРНК аналогичными не мечеными ПЦР фрагментами дцДНК и дуплексом синтетических молекул дцРНК. Были получены крайне сложно интерпретируемые результаты, которые в целом свидетельствовали о том, что существует несколько вариантов интернализации, механизмы которых исследуются.

Были оценены временные параметры попадания FAM-дцРНК в клетку. Используя DIC/флуоресцентную микроскопию, установлено, что насыщение клеток молекулами дцРНК происходит в течение 40 минут, после чего кривая насыщения выходит на плато (**Рисунок 33**).

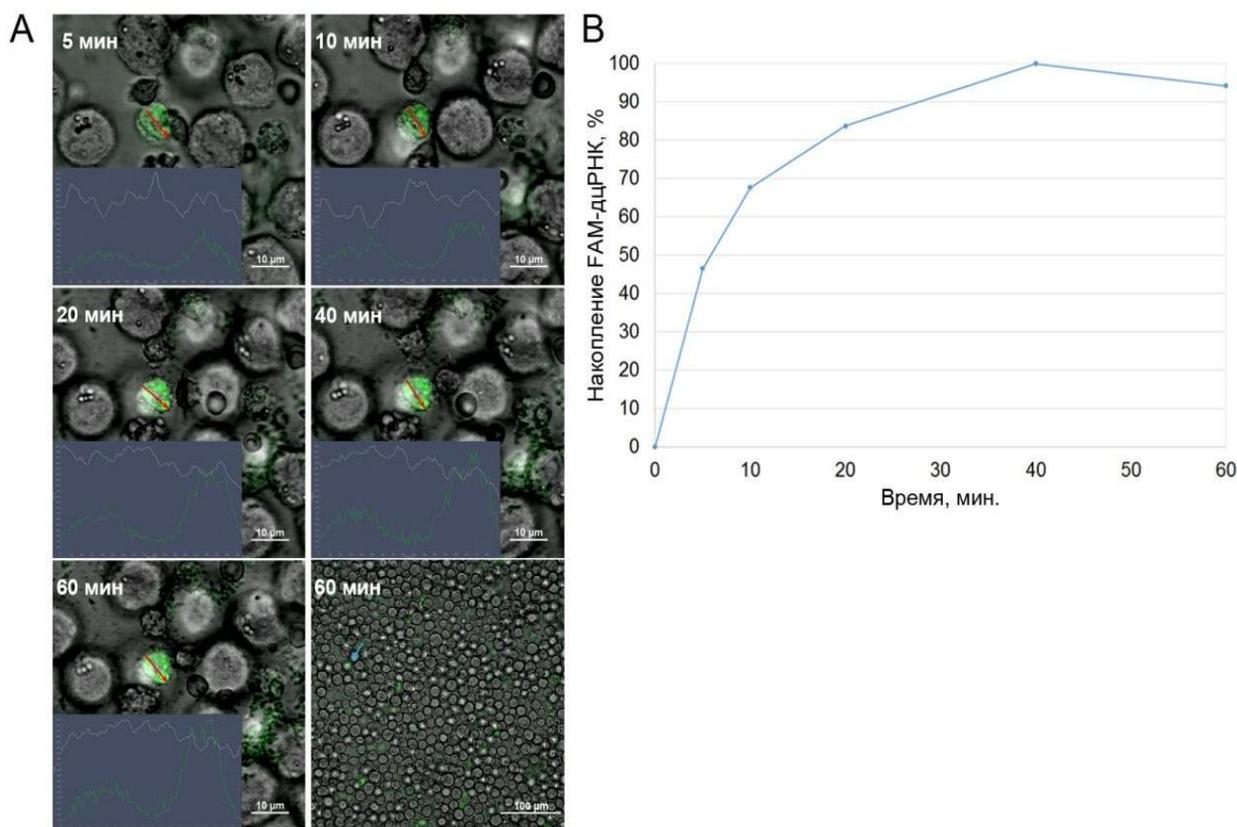


Рис. 33. А) Микроскопический анализ, характеризующий динамику накопления FAM-дцРНК в одной и той же клетке Krebs-2. Имиджи получены через 5, 10, 20, 40 и 60 минут после добавления в среду меченого зонда. Плоты в левом углу имиджей характеризуют интенсивность FAM по линии анализа (красная стрелка). В) График динамики накопления FAM-дцРНК в клетках Krebs-2.

3.14. Характеристика некоторых элементов процесса интернализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда в клетки Krebs-2

3.14.1. Определение моды взаимодействия FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда с факторами поверхности клетки

В работе [Ritter et al., 2022] несколькими подходами охарактеризована мода взаимодействия TAMRA-дцДНК зонда и стволовых опухолевых клеток Krebs-2. Показано, что первоначальный контакт дцДНК и стволовых опухолевых клеток Krebs-2 осуществляется за счет электростатического притяжения положительно заряженной поверхности стволовых опухолевых клеток и отрицательно заряженной молекулы дцДНК. Контакт определяется гепарин-связывающим доменом и кластерами положительно заряженных аминокислот, в большом количестве присутствующих на белках гликокаликса стволовых опухолевых клеток. На втором этапе взаимодействия происходит формирование прочной химической или молекулярной связи между гепарин-связывающим доменом и фрагментом дцДНК на молекулах белков, ассоциированных с липидными рафтами. На третьем этапе происходит кавеоло-зависимая интернализация фрагментов дцДНК в комплексе со сквенжер рецепторами.

Для определения моды взаимодействия FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда с факторами поверхности клетки была проведена серия экспериментов, аналогичных анализу взаимодействия дцДНК и стволовых опухолевых клеток Кребс-2. 1) Была проведена серия электрофорезов в свободном объеме с последующей оценкой процента FAM+ клеток у противоположных полюсов электрофоретической камеры; 2) оценен заряд клеток, интернализирующих зонд двуцепочечной РНК, с использованием специфического положительно заряженного красителя; 3) оценен заряд клеток, интернализирующих FAM-дцРНК, с использованием блокирования положительного заряда гепарином.

3.14.1.1. Гель-электрофорез клеток Кребс-2 в свободном объеме с последующей оценкой количества клеток, интернализирующих FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, у противоположных полюсов электрофоретической камеры

Был разработан метод оценки заряда клеток с использованием электрофореза в свободном объеме в физ. растворе. Использование других электрофоретических систем (ТАЕ, ТБЕ, PBS) приводило к дегенеративному изменению морфологии клеток и их осмотическому разрушению. Суть метода сводилась к следующему. Клетки помещались в диализный пакет, герметично закрытый с двух сторон. На две стороны пакета накладывались мосты из ватмана 3ММ и проводился электрофорез не более 40 минут. Происходила частичная разнонаправленная миграция разнозаряженных клеток. В установочных экспериментах с эритроцитами и в экспериментах с TAMRA-дцДНК было показано, что эритроциты мигрируют в «+», а TAMRA+ клетки мигрируют в «-» направлении [Ritter et al., 2022]. После электрофореза клетки Кребс-2 извлекались из своей части диализного пакета, обрабатывались FAM-дцРНК, и количество FAM+ клеток оценивалось микроскопически или проточной цитометрией. Было проведено 7 экспериментов. Показано, что в отличие от TAMRA-дцДНК [Ritter et al., 2022], процентное содержание клеток, интернализирующих FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, у обоих полюсов достоверно не отличалось (**Рисунок 34**). Полученный результат мог означать, что, первичный контакт дцРНК с клеткой в большей степени определяется не зарядом клеточной поверхности, как это достоверно показано для дцДНК [Ritter et al., 2022], а иными факторами.

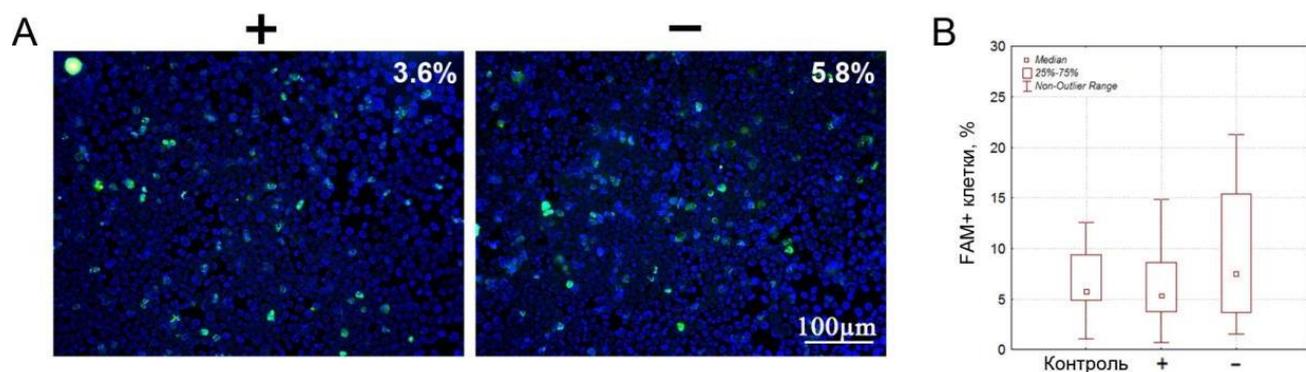


Рис. 34. Оценка количества клеток, интернализирующих FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, у противоположных полюсов электрофоретической камеры после гель-электрофореза клеток Кребс-2 в свободном объеме. А) Микроскопические снимки клеток Кребс-2, выделенных из двух половин электрофоретической мини камеры и обработанных FAM-дцРНК. В верхнем правом углу указан процент клеток, захвативших FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда. В) Суммарный график, отражающий количество FAM+ клеток у обоих полюсов электрофоретического объема, построенный по результатам 5 независимых экспериментов.

3.14.1.2. Оценка моды интернализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда с использованием специфического положительно заряженного красителя Basic Blue 41

Для подтверждения первого результата по определению заряда FAM+ клеток были проведены эксперименты по нейтрализации заряда клеток Кребс-2 красителем Basic Blue 41 (катионный или положительно заряженный краситель) с последующей оценкой процентного содержания FAM+ клеток (**Рисунок 35**). Если интернализация зависит от заряда поверхности клетки и не связана с иным механизмом, присутствующим на отрицательно заряженных клетках, то при изменении последовательности добавления FAM-дцРНК и Basic Blue 41 картина распределения меченого материала не изменится и клетки будут находиться вне или частично вне облака окрашенных катионным красителем клеток. В противном случае будут наблюдаться видимые изменения в распределении меченых флуорохромным красителем и катионным красителем клеток. Перекрытие облаков, в этом случае, можно будет объяснить тем, что существует иной механизм взаимодействия дцРНК и клетки.

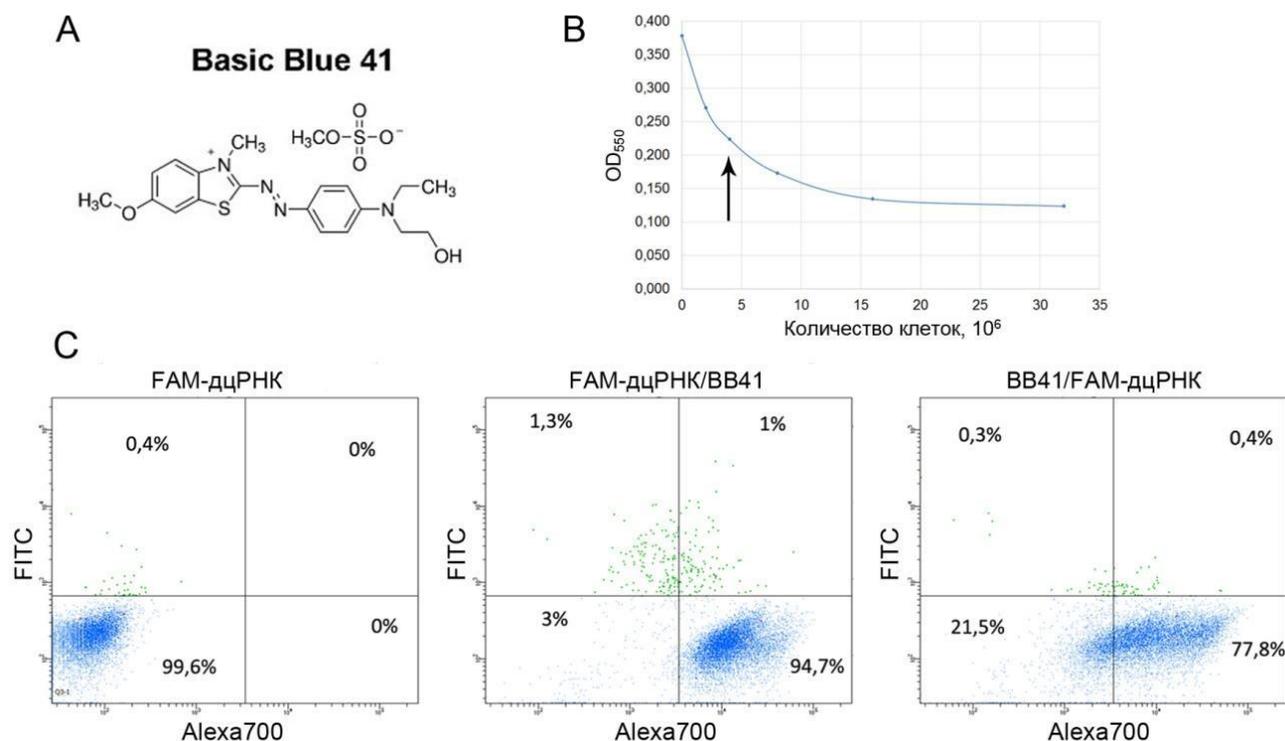


Рис. 35. Интернализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда с использованием специфического положительно заряженного красителя Basic Blue 41. А) Молекула Basic Blue 41. В) Кривая насыщения красителем клеток Кребс-2. По оси X – оптическая плотность Basic Blue 41, по оси Y – количество клеток Кребс-2 (млн.). С) Анализ методом проточной цитометрии эффекта интернализации клетками Кребс-2 при последовательном добавлении: «FAM-дцРНК -> Basic Blue 41»; «Basic Blue 41 -> FAM-дцРНК». Первый блок демонстрирует контрольное распределение клеток, обработанных FAM-дцРНК, по популяциям.

FAM+/Basic Blue 41. Часть FAM+ клеток лежит вне области клеток, окрашенных катионным красителем. Этот факт может свидетельствовать, что интернализация отрицательно заряженных молекул дцРНК в этом случае произошла в «+» клетки. Частичное перекрытие можно объяснить тем, что часть клеток, несущих отрицательный заряд, при этом содержит положительно заряженные компоненты оболочки, которые и определяют интернализацию определенного количества дцРНК.

Basic Blue 41/FAM+. Картина распределения полностью поменялась. Практически все FAM+ клетки находятся в облаке клеток, также меченых катионным красителем. Мы следующим образом интерпретируем полученные результаты. Существует как минимум два вектора ассоциации дцРНК с клетками Кребс-2. За счет заряда и за счет иного механизма взаимодействия с клеточной оболочкой. Причем второй механизм, определяющий контакт, не зависит от заряда и доминирует над первым. Так, при блокировании «-» заряда катионным красителем, этот путь открывается на клетках, имеющих отрицательный заряд оболочки, и дцРНК взаимодействует только через него.

3.14.1.3. Оценка заряда клеток, интернализирующих FAM-меченый материал в составе дцРНК зонда, с использованием гепарина

В наших работах было установлено, что гепарин полностью блокирует эффект интернализации TAMRA-дцДНК в клетки Кребс-2 [Dolgova et al., 2016 (a); Ritter et al., 2022]. Эти результаты означали тот факт, что и дцДНК, и гепарин конкурируют за факторы связывания с клеточной поверхностью. Были проведены эксперименты по оценке интернализации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда. Оказалось, что гепарин в максимальной экспериментальной концентрации 4 МЕ/мл не блокирует интернализацию FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда (**Рисунок 36**). Этот факт может означать, что для ассоциации с молекулами дцРНК используется иной, по сравнению молекулами дцДНК, механизм взаимодействия, не зависящий от пути, определяемым гепарином.

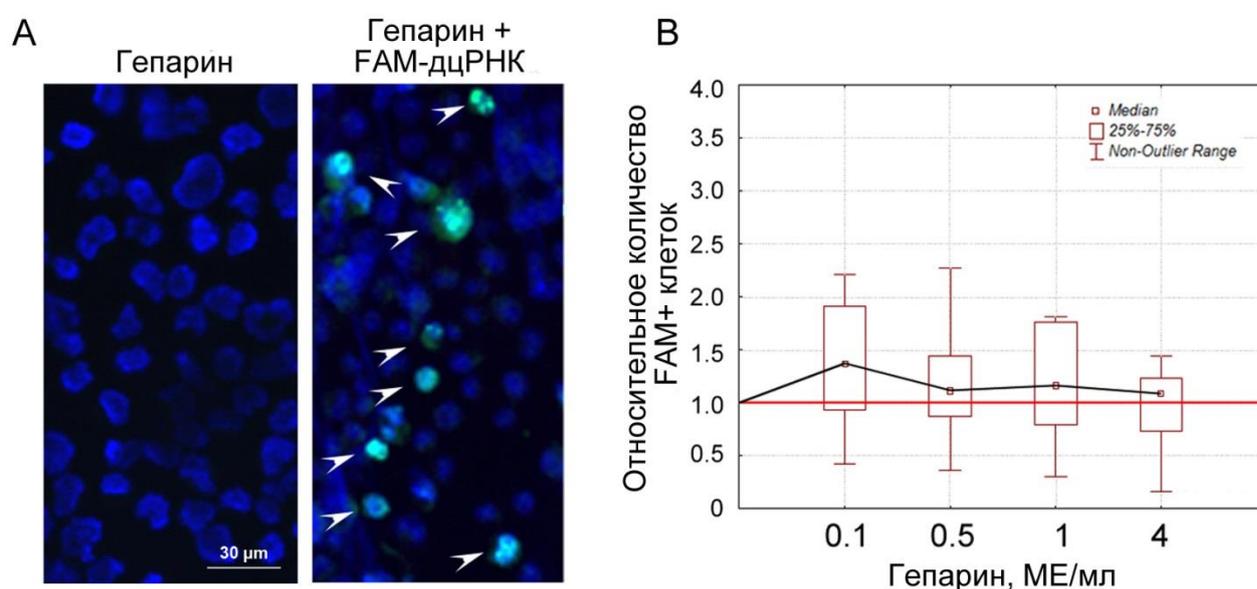


Рис. 36. Ингибирование эффекта интернализации гепарином. А) Микрофотография клеток. В) Процентное содержание FAM+ клеток при добавлении различных количеств гепарина (n=10).

3.14.1.4. Характеристика изменений пространственного положения FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда в клетках Кребс-2 после проведенного микрогель-электрофореза

Был разработан экспериментальный дизайн, основой которого являлся клеточный микрогель-электрофорез. Предполагалось, что в зависимости от способа фиксации FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда на оболочке клеток, в ходе электрофореза будет визуализировано изменение положения меченого материала, стикерованного на оболочке клетки (как это было показано для фрагментов дцДНК [Ritter et al., 2022]). Были выбраны следующие параметры. Клетки инкубировались с зондом от 5 минут до 60 минут. Электрофорез проводили либо в два этапа по 15 минут, с визуализацией клеток на каждом этапе, либо 30 минут без промежуточной оценки. Были получены следующие морфологические варианты изменения паттерна взаимодействия FAM-дцРНК и клеток Кребс-2. Для основной массы клеток, меченых

ФАМ-дцРНК, меченый материал не меняет своего расположения относительно исходного положения в клетке (**Рисунок 37А**). Так же как, и в случае с дцДНК, выявляются клетки, с поверхности которых меченый ФАМ-дцРНК материал «слущивается» в процессе электрофореза (**Рисунок 37В**). Не было обнаружено вариантов сдвига по клеточной периферии паттерна ФАМ-дцРНК. Полученные данные могут означать, что в подавляющем большинстве случаев первичное взаимодействие молекул дцРНК (в отличие от дцДНК [Ritter et al., 2022]), происходит с жестко закрепленными факторами клеточной оболочки, после чего фрагменты дцРНК немедленно интернализируются во внутреннее пространство клетки.

Обнаруженное слущивание ФАМ-меченого материала так же, как и в случае с дцДНК, мы объясняем взаимодействием с положительно заряженными факторами клеточной оболочки. При этом в этот момент времени отсутствуют факторы клеточной поверхности, определяющие прочный физический контакта с фрагментами дцРНК и его интернализацию, что, как предполагается, связано с G2/M фазой клеточного цикла и идущим процессом деления [Dolgoва et al., 2016 (a)].

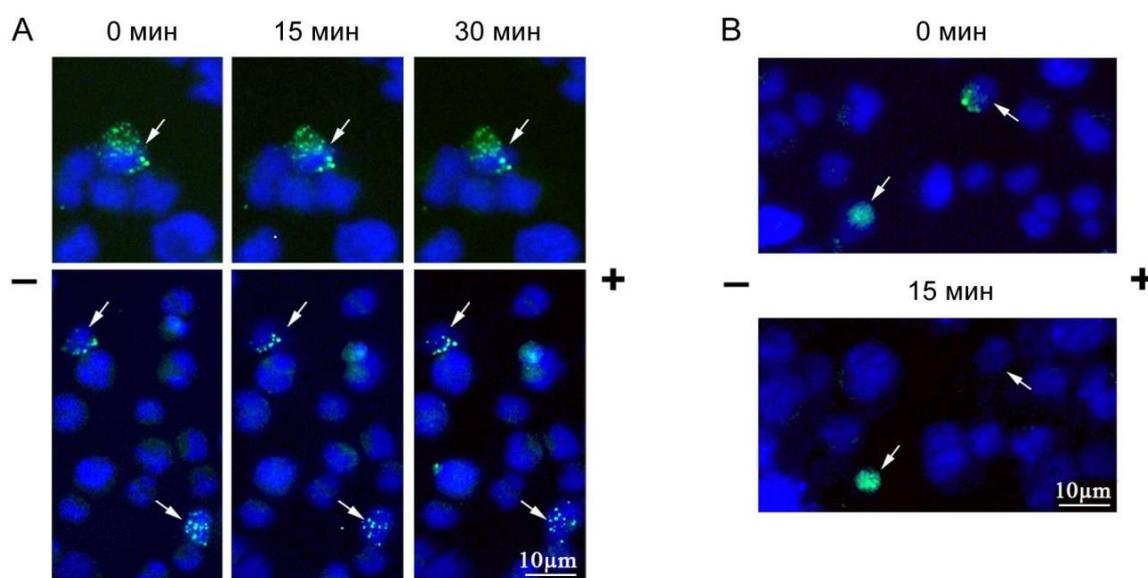


Рис. 37. Результаты микрогель-электрофореза на предметном стекле клеток Кребс-2 после обработки ФАМ-дцРНК, цитоспина и заливки в 1% легкоплавкую агарозу. Над блоками обозначена продолжительность электрофореза. «-» и «+» полюса электрофоретической разгонки. Стрелками обозначен ФАМ-меченый материал. А) ФАМ-дцРНК не меняет пространственного положения в ходе электрофоретической разгонки. Время инкубации с зондом 40 мин. В) ФАМ-дцРНК «слущивается» в ходе электрофореза. Для наглядности приведена клетка из того же поля, в которой меченый материал не меняет своего положения. Время инкубации с зондом 60 мин.

Используя систему *in vivo* кросслинка биотинилированных дцРНК и клеток Кребс-2 и аффинной сорбции на битцах, покрытых стрептавидином, установлено, что одним из факторов связывания биотин-меченого материала в составе дцРНК зонда и клеток, предположительно, является высокомолекулярный белок с молекулярной массой более 500 кДа (**Рисунок 38**).

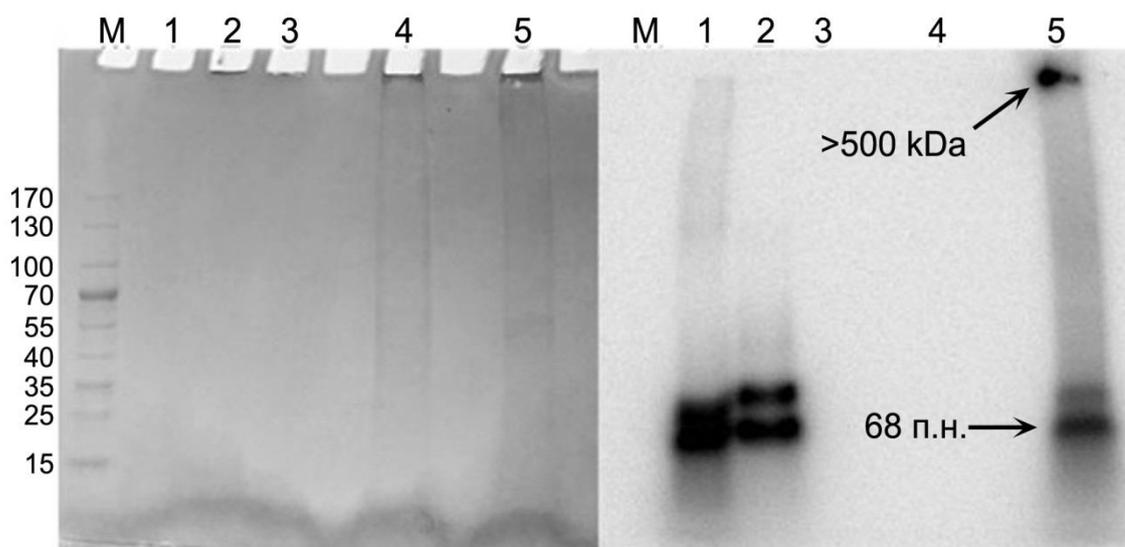


Рис. 38. Определение фактора связывания дцРНК на клетке. М – белковый маркер молекулярного веса, 1 – P^{32} -биотин-дцРНК, 2 – P^{32} -биотин-дцРНК + частицы со стрептавидином, 3 – частицы со стрептавидином, 4 – Контроль, 5 – Эксперимент: клетки Кребс-2 инкубировали с P^{32} -биотин-дцРНК, индуцировали сшивки ультрафиолетовым облучением, лизировали и инкубировали с частицами со стрептавидином. Слева гель окрашен Бромфенолом. Справа автордиограмма геля.

Важным выводом из проведенных экспериментов было обнаружение факта немедленной интернализации меченого материала внутрь клетки и его отсутствия на клеточной поверхности, что подтверждалось сохранением неизменного паттерна интернализованного материала после обработки РНКазой и последующего электрофореза. Однако, существование кратковременных контактов с мембраной клетки возможно, и подтверждается обнаруженным эффектом сдувания меченого материала в процессе электрофореза.

3.14.2. Прямое доказательство интернализации искусственной дцРНК в эукариотическую клетку (на примере клеток карциномы Кребс-2)

Фиксированное положение FAM-меченого материала в составе дцРНК зонда внутри клетки независимо от воздействия электрического поля предполагало его отсутствие на поверхности клетки. Проведенный фазово-контрастный анализ указывал на то, что меченый флуорохромом материал локализуется внутри клетки Кребс-2 (**Рисунок 39**), при этом метка концентрируется в нескольких определенных районах ядра. Это означало, что для сортировки клеток можно использовать флуорохромную метку и при этом будут собираться клетки, содержащие меченый материал во внутренних компартаментах, а не на поверхности. То есть будут собраны клетки с истинно интернализированным FAM-меченым материалом в составе дцРНК зонда.

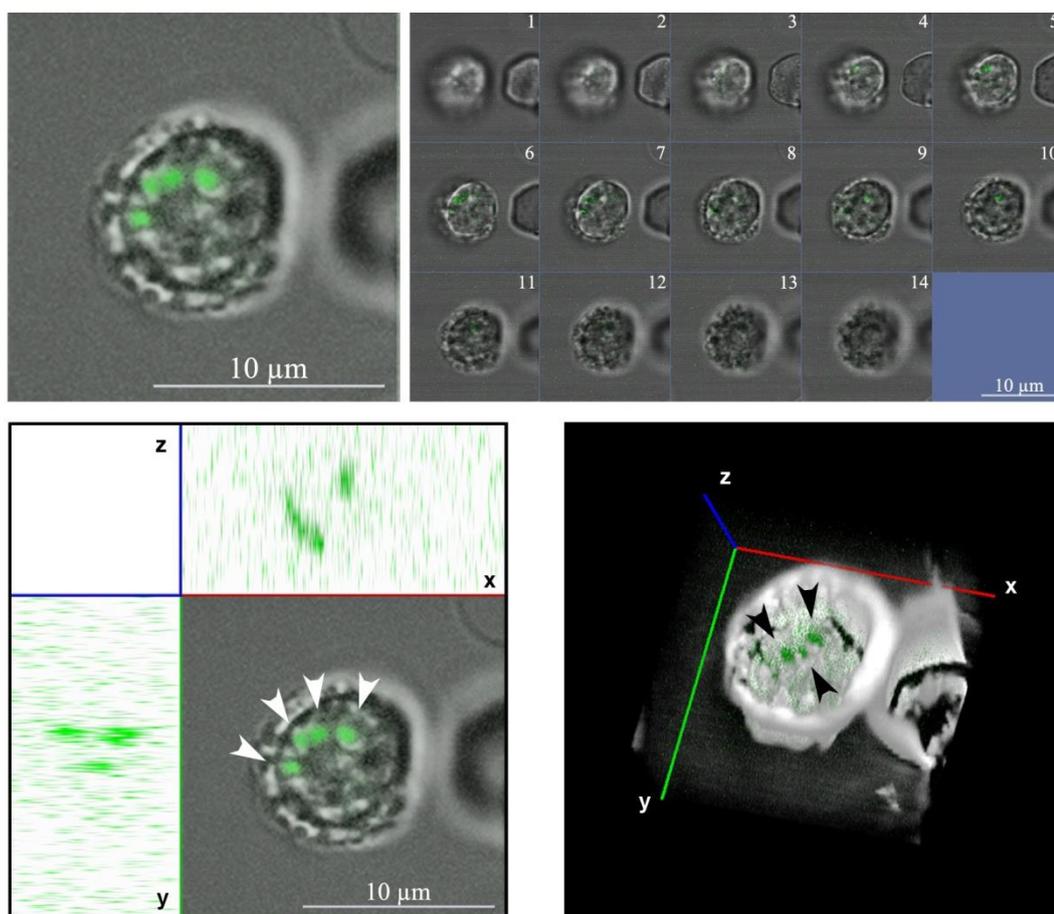


Рис. 39. Галерея оптических срезов и собранная на их основе объемная модель клетки Кребс-2 с расположенной в ней FAM-метки.

Многочисленные попытки с использованием различных подходов, включая stem-loop PCR, не позволили прямо доказать факт интернализации дцРНК в клетку. Связано это было с минимальным количеством материала, доступного для исследования и ярко проявившаяся не специфика. Для прямого доказательства факта интернализации дцРНК был разработан и осуществлен следующий экспериментальный подход. Искусственная дцРНК была дополнительно к FAM мечена радиоактивным фосфором по 5' концу. Клетки асцита Кребс-2 инкубировали с FAM- γ P³²-дцРНК. Далее клетки сортировали по признаку FAM+ и FAM-. Сортированные клетки оценивали по включению радиоактивного фосфора. В FAM- клетках радиоактивность не детектировалась. После сортировки и счета радиоактивности из клеток выделяли РНК и проводили полиакриламидный гель-электрофорез. Полученные результаты свидетельствуют, что исходный FAM- γ P³²-дцРНК в неизменном виде присутствует в клетке Кребс-2 (**Рисунок 40А**).

Ранее проведенный фазого-контрастный микроскопический анализ указывал на то, что интернализованная клеткой дцРНК локализуется в ядре. Чтобы проверить полученный результат в другой серии экспериментов были выделены ядра из отсортированных FAM+ клеток. Суммарная популяция сортированных клеток в осадке считала 30 имп/сек (конкретный

эксперимент). Выделенные ядра в осадке считали 25 имп/сек (тот же конкретный эксперимент). Ядра лизировали замораживанием/оттаиванием. Такая обработка позволила определить степень интеграции дцРНК с факторами ядра (**Рисунок 40В**). Как следует из результатов прямого анализа включения радиоактивного фосфора в целую клетку и ядра и радиоактивной засветки, практически весь дцРНК-зонд находится в ядре и ассоциирован с факторами ядра.

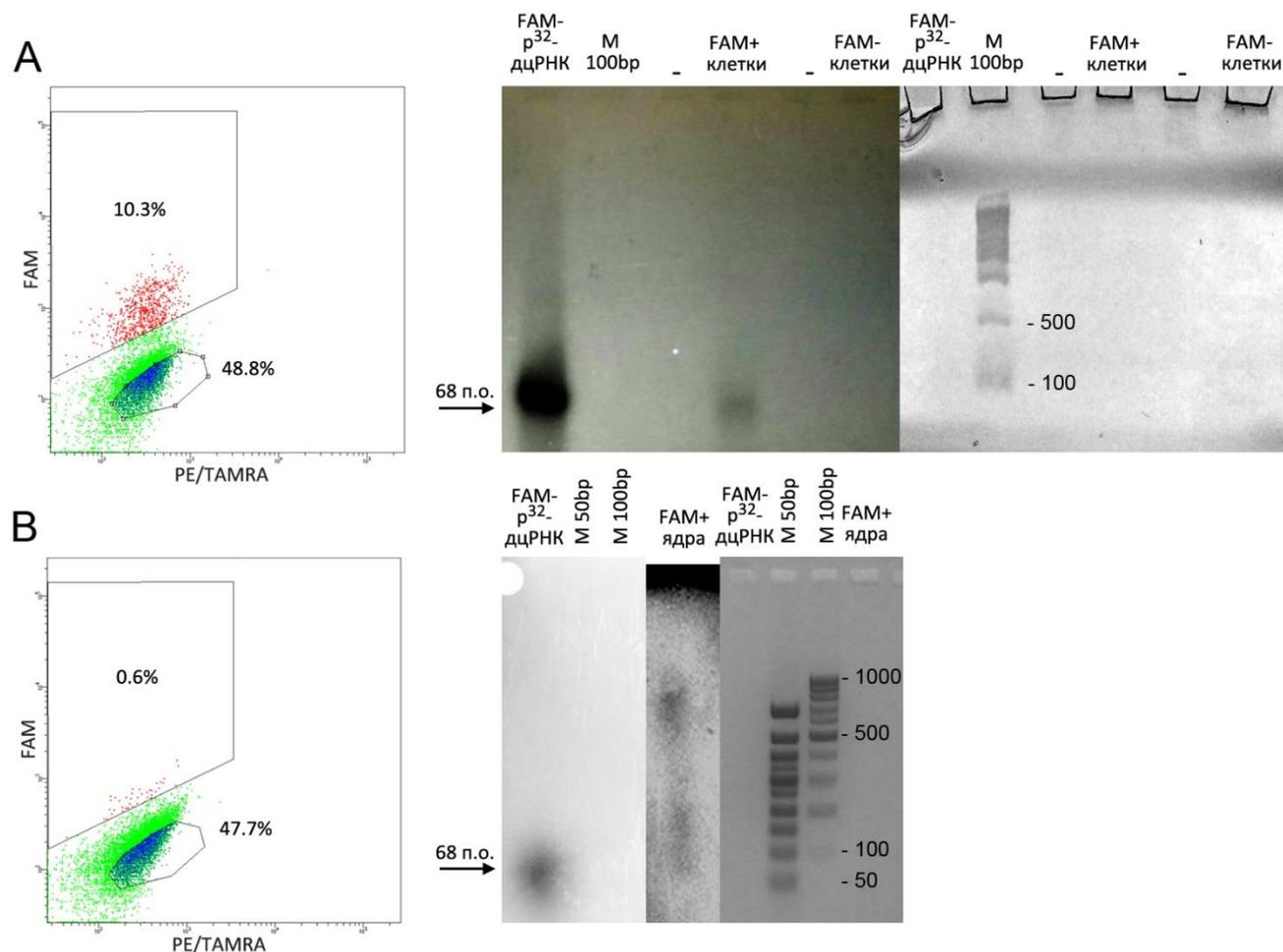


Рис. 40. Авторадиограмма и электрофорез в 2% агарозном геле суммарной РНК, выделенной из целых FAM+ клеток Кребс-2 с использованием тризола, (А) и лизата ядер FAM+ клеток Кребс-2, полученного путем серии замораживания/оттаивания (В). Справа приведены графики FACS сортировки FAM+ клеток Кребс-2, полученные в соответствующих независимых экспериментах.

3.14.3. Влияние блокирования некоторых путей эндоцитоза на содержание FAM+ клеток Кребс-2

Проведенный в предыдущем разделе анализ свидетельствует, что FAM-дцРНК интернализуется в стволовые опухолевые клетки Кребс-2. Для определения механизма интернализации была проведена большая серия экспериментов с использованием химических веществ, блокирующих различные клеточные пути интернализации экстраклеточной FAM-дцРНК, после чего оценивалось процентное содержание FAM+ клеток. Было проанализировано влияние 8 ингибиторов различных путей эндоцитоза. Для исследования путей эндоцитоза FAM-дцРНК были использованы диназор как ингибитор динаминзависимых путей эндоцитоза,

хлорпромазин как ингибитор клатринзависимого пути, нистатин и М β CD для ингибирования путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами, в том числе кавеолинзависимого пути эндоцитоза. Цитохалазин D и EIPA использовали как ингибиторы макропиноцитоза, вортманнин – как ингибитор клеточных фосфоинозитид-3-киназ, а также азид натрия как ингибитор синтеза АТФ.

Было обнаружено, что **вортманнин** в концентрации 0.0003 - 1 мкг/мл, **азид натрия** в концентрации 1,0 мкг/мл и **нистатин** в концентрации 0,1 - 400 мкг/мл статистически значимо снижают процент клеток, интернализирующих FAM-дцРНК (**Рисунок 41**). Резко возрастающие значения при высоких концентрациях ингибитора означают полное разрушение барьерной функции цитоплазматической мембраны (морфологический анализ, проточная цитометрия).

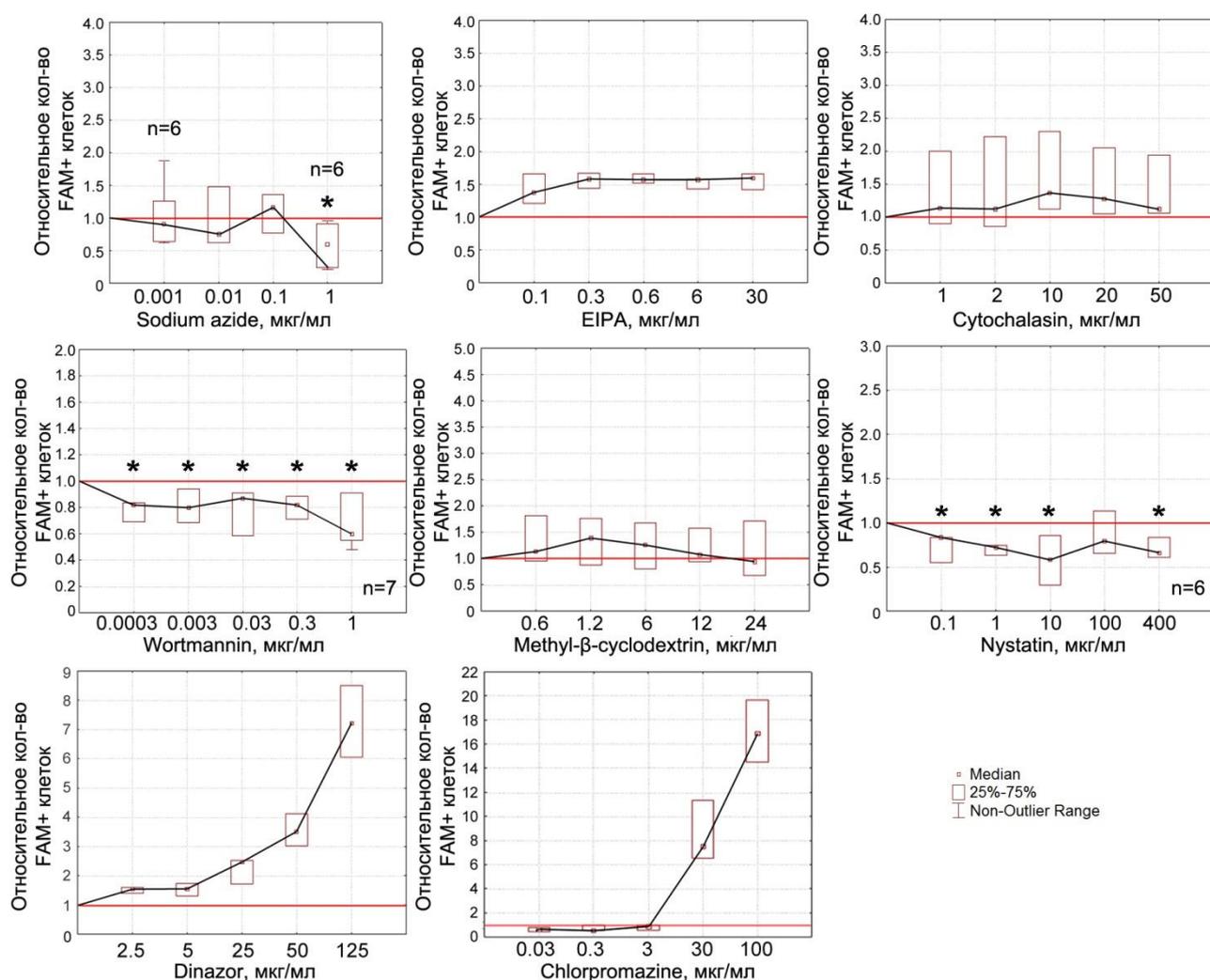


Рис. 41. Ингибирование различными веществами интернализации FAM-дцРНК клетками Кребс-2. Приведены графики, отображающие содержание FAM+ клеток при ингибировании интернализации в клетку различными количествами соответствующих ингибиторов. Звездочками обозначены значения, статистически отличающиеся от контрольного, без использования ингибитора (* $p < 0,05$, парный тест Вилкоксона). Красной линией обозначено содержание FAM+ клеток среди клеток Кребс-2 без использования ингибиторов, принятое за 1 ($n=3$ во всех случаях, если это специально не указано).

3.15. Общий вывод по интернализации дцРНК в низкодифференцированную эукариотическую клетку. Экстраполяция на ГСК

дцРНК немедленно доставляется во внутренние компартменты низкодифференцированной эукариотической клетки клатрин/кавеолин-зависимым эндоцитозом с использованием энергии АТФ. На интернализацию не влияют общий заряд клетки, присутствие гепарин-связывающего домена и кластеров положительно заряженных аминокислот. Предположительный фактор связывания дцРНК клеткой – белок с молекулярной массой более 500 кДа.

Совокупность полученных данных по интернализации с использованием суррогатной модели Кребс-2 и вся полнота косвенной информации по биологическим свойствам ГСК после их обработки препаратом дцРНК, принципиальными из которых являются: доставка FAM флуорохрома в ГСК только в составе полимерной дцРНК и длительный, до 12 суток, радиозащитный эффект, который можно объяснить только длительным присутствием внутри клетки депонированной дцРНК, свидетельствуют, что низкодифференцированные мультипотентные гемопоэтические прогениторы, аналогично низкодифференцированным стволовым опухолевым клеткам Кребс-2, интернализуют фрагменты дцРНК.

В результате воздействия дцРНК, примитивные гемопоэтические предшественники сохраняют жизнеспособность, пролиферируют с образованием колоний гемопоэтических ростков в селезенке. Формируется новая иммунная и кроветворная система. Мыши спасаются от летальной дозы γ -облучения.

Часть IV. Предположительная модель участия молекул дцРНК в репарации аварийных и сложных двуцепочечных разрывов

3.16. Модель молекулярного механизма радиозащитного действия препарата дцРНК

В четвертой части исследования была проведена отдельная экспериментальная работа, характеризующая возможный молекулярный механизм радиозащитного действия препарата дцРНК. Приводятся аргументы в пользу того, что радиозащитный эффект действия фрагментов дцРНК определяется их участием в процессе репарации аварийных и сложных ДЦР, индуцированных γ -радиацией в ГСК.

Мышам вводили РНК за 1 час, через 1 час и через 4 часа после летального облучения. Оказалось, что эффект радиопротекции наблюдается при введении РНК за 1 час и через 4 часа после летальной дозы радиации. Патоморфологический анализ селезенок таких мышей демонстрирует ярко выраженную пролиферацию потомков спасенных прогениторов при введении РНК за 1 ч до и через 4 часа после облучения (**Рисунок 42**).

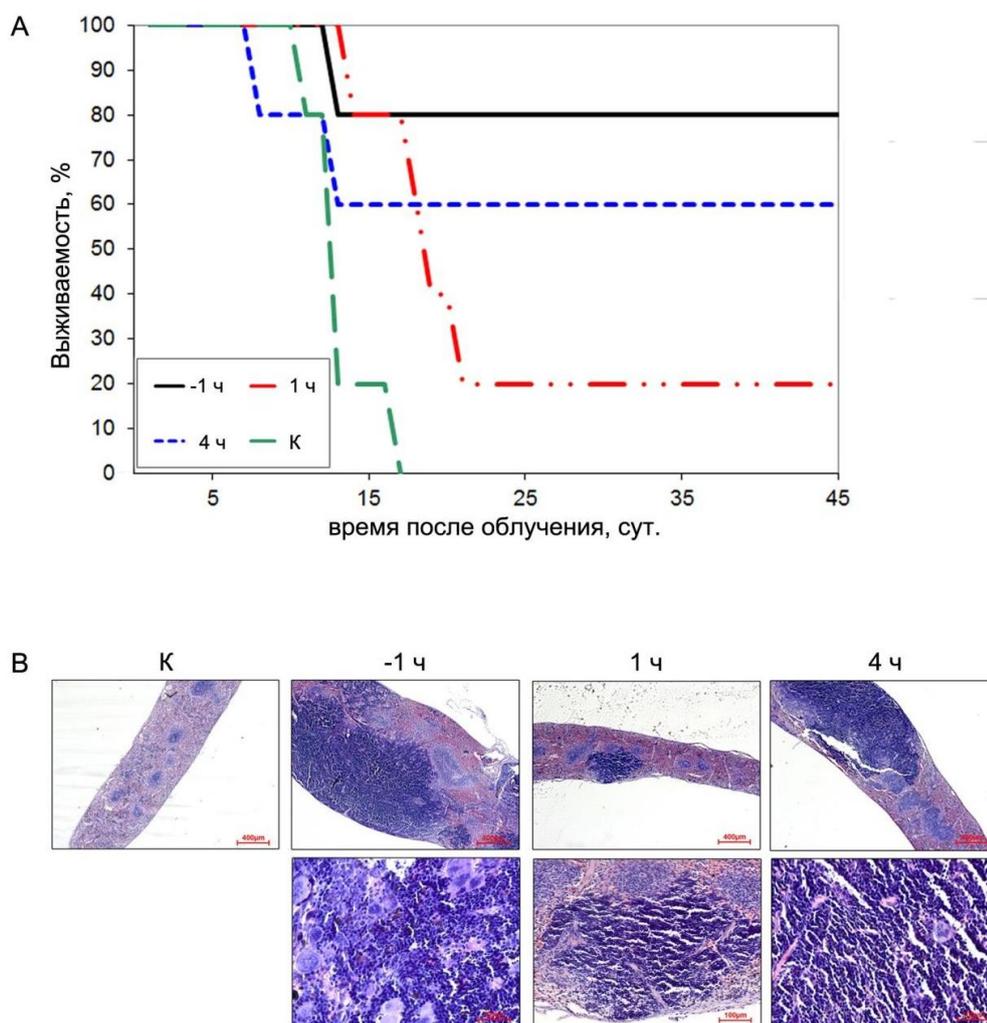


Рис. 42. Радиопротекторное действие препарата РНК при введении мышам 7 мг препарата РНК за 1 час до облучения (-1 ч), через 1 час (1 ч) или через 4 часа (4ч) после облучения дозой 9,4 Гр. (К) – мыши получали аналогичные инъекции физиологического раствора. А) График выживаемости экспериментальных животных (n=5, p<0.05). В) Гистологические срезы селезенок экспериментальных животных на 9-ый день после облучения. (n=5)

Было оценено количество ДЦР и количество основных факторов репарации ДЦР двух типов в экспериментальных точках: XRCC4, как показатель активности NHEJ, и RAD51, как показатель активности гомологичной рекомбинации.

Оказалось, что мажорный пик ДЦР приходится на 1 час после облучения (**Рисунок 43А**). Это физические ДЦР, возникшие в результате γ -облучения. Также ДЦР продолжали детектироваться вплоть до 4 часов после γ -облучения. Следуя литературным данным [Озеров и Осипов, 2015], это функциональные двуцепочечные разрывы, манифестирующие репарацию сложных повреждений ДНК, например, межцепочечных сшивков. Параллельный полуколичественный (значения нормировались на β -актин) вестерн-блот анализ показал, что количество XRCC4 (NHEJ) имеет пик в 1 час после облучения. У RAD51 (гомологичная рекомбинация) также имеется пик в 1 час, и наблюдается повторный рост количества белка с 2 до 4 часов после облучения (**Рисунок 43С**).

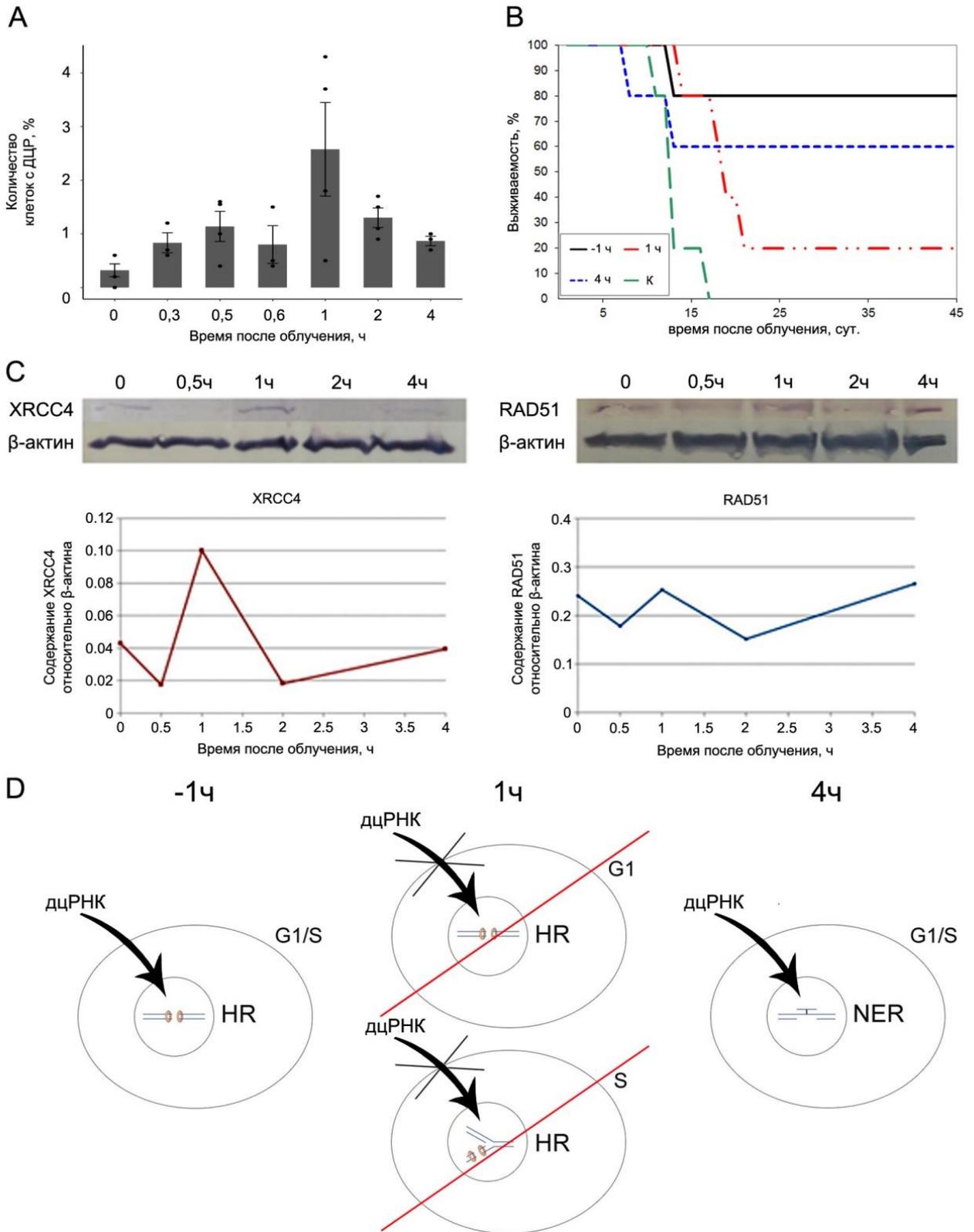


Рис. 43. Оценка динамики количества ДЦР и белков репарации в мышах, после воздействия летальной дозы γ -радиации 9,4 Гр. А) Продолжительность цикла репарации ДЦР в клетках костного мозга мышей после воздействия летальной дозы γ -радиации 9,4 Гр. На графике приведено относительное количество клеток костного мозга мышей, в которых детектируются ДЦР. Приведена стандартная ошибка среднего. В) График выживаемости экспериментальных животных. $p < 0.05$. С) Western-блот анализ содержания XRCC4 и RAD51 в экстрактах белков, полученных из клеток костного мозга, через различные временные интервалы после облучения. Оценка проводилась в программе GelPro Analyzer по отношению интенсивности окрашивания HRP-DAP таргетного белка к актину. Д) Предположительная схема взаимодействия дцРНК с ГСК при ее введении за 1 час до облучения (-1 ч), через 1 час после облучения (1 ч) либо через 4 часа после облучения (4 ч).

Следуя графику витальных тестов (**Рисунок 43В**), можно предположить, что РНК при ее введении в организм облученного животного в момент максимального количества ДЦР, не участвует в их репарации в клетках. Простейшее объяснение этому состоит в том, что клетки в состоянии радиотоксического стресса не захватывают молекулы дцРНК. В то же время инъекции за 1 час до и через 4 часа после облучения спасают летально облученных мышей. Этот факт свидетельствует о том, что молекулы дцРНК будут выполнять радиозащитную функцию при их доставке в ГСК до цитотоксического стресса или после него. В первом случае находящиеся внутри клетки фрагменты дцРНК принимают участие в репарации аварийных ДЦР, преобладающих через 1 час после облучения и функциональных ДЦР, возникающих в ходе репарации сложных повреждений через 2-4 часа после облучения. Во втором случае фрагменты дцРНК участвуют в основном в репарации функциональных ДЦР, репарация которых начинается примерно через 2-4 часа после облучения.

Таким образом, общая схема участия молекул дцРНК в репарации двуцепочечных разрывов может выглядеть следующим образом (**Рисунок 43D**).

1. В момент геномного стресса, наблюдаемого через 1 ч после облучения, ГСК теряют способность интернализировать фрагменты дцРНК. В этом случае в клетке отсутствует дцРНК-матрица, участвующая в репаративных событиях. ГСК элиминируются апоптозом вследствие аберрантного митоза, что приводит к гибели экспериментальных животных.

2. При инъекции дцРНК до облучения она депонируется во внутриклеточных компартментах ГСК, что позволяет ей, в случае возникновения ДЦР, участвовать в репарации как аварийных, так и сложных повреждений, например, межцепочечных сшивков.

3. При инъекции через 4 часа после облучения ГСК уже преодолели острую фазу радиотоксического стресса и восстановили способность захватывать дцРНК. Доставленные во внутренние компартменты ГСК двуцепочечные молекулы участвуют в репарации сложных повреждений, например, межцепочечных сшивков.

В результате указанных событий происходит корректная репарация ДНК с восстановлением хромосомной целостности, в результате чего ГСК сохраняют свою жизнеспособность.

В принципе возможны как минимум три варианта радиозащитного действия молекул РНК:

1. Активация системы ИЛ-1/ИЛ-8, терминальное созревание нейтрофилов, их выход на периферию и индукция нетоза с высвобождением нейтрофильных трапов в капиллярах периферической крови. В результате индуцируется системная воспалительная реакция и тотальная гипоксия, органов гемопоэза, что приводит к определенному радиопротекторному эффекту (см. Б-190).

2. Блокирование взаимодействия TRP-I/CD47 и, как следствие, подавление общеклеточного метаболизма и энергетического потенциала клетки (блокировка митохондриального синтеза).

3. Привлечение в место ДЦР РНК-связывающих репаративных белков.

4. Участие дцРНК в репарации повреждений, вызванных γ -облучением, и прежде всего ДЦР и межцепочечных сшивок.

Проведенный литературный анализ и полученные нами данные свидетельствуют, что основным вектором радиозащитного действия является участие молекул дцРНК в репарации летальных повреждений ДНК:

- во-первых, для дцРНК не показано активирующее действие на систему ИЛ-1/ИЛ-8. Также на поверхности ГСК не детектируется CD47 антиген. Это означает, что в (на) ГСК нет триггера соответствующих метаболических каскадов, приводящих к индукции радиозащитных механизмов, определяемых указанными факторами.

- во-вторых, главным в формулировке вывода об участии молекул дцРНК в репарации ДЦР были опыты с облучением через 4, 8, 12 дней после введения РНК, где показано радиопротекторное действие препарата, введенного экспериментальным мышам вплоть до 12 суток. Этот факт означает, что радиозащитный эффект продолжается, как минимум, до 12 суток, что возможно только в результате депонирования активного вещества (читай молекулы дцРНК) во внутренних компартментах ГСК. Первые два варианта объяснения радиозащитного механизма (активация системы ИЛ-1/ИЛ-8), блокирование взаимодействия TRP-I/CD47) имеют ограниченные временные рамки радиозащитного действия, не превышающие нескольких часов [Neta, Douches and Oppenheim, 1986; Laterveer et al. 1995; Ha, Debnath and Neamati, 2017; Sharma and Kale, 1993].

Только тот факт, что молекулы дцРНК попадают внутрь клетки, длительно присутствуют во внутриклеточном пространстве и участвуют в репарации летальных повреждений ДНК, может объяснить радиозащитный эффект препарата дцРНК.

3.17. Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата дцРНК и штатного радиопротектора Б-190

Штатный радиопротектор Б-190 (индралин) суживает сосуды и создает временную гипоксию в тканях организма. Гипоксичные условия снижают количество образующихся в результате γ -облучения свободных радикалов, снижая тем самым степень окислительных реакций и как результат формирования продуктов свободно-радикальных реакций: активных форм кислорода, оксидов азота, продуктов перекисного окисления липидов и других реактивных производных, разрушающих мембрану и хроматиновый остов хромосом ядра. Производные

индолилалкиламинов: агонисты биологически активных аминов, способные через специфические клеточные рецепторы вызывать острую гипоксию и угнетение метаболизма в радиочувствительных тканях (стимуляторы альфа- и бета-адренергических, аденозиновых, Д-серотониновых, H₁-гистаминовых и ГАМК-эргических рецепторов) [Dent et al., 2003; Wang et al., 1998; Ward, 1998].

Было проведено сравнение эффективности радиозащитного действия радиопротектора Б-190 и препарата РНК в одном эксперименте при введении препаратов за 30 минут до облучения в дозе 9.4 Гр. Результаты представлены на **рисунке 44**. Установлено, что препарат суммарной РНК обладает ярко выраженным радиопротекторным действием, не уступающим по эффективности штатному препарату Б-190. Выживаемость на 60 сутки для группы мышей, получавших препарат РНК, составила 77,7%, для Б-190 – 55,5%.

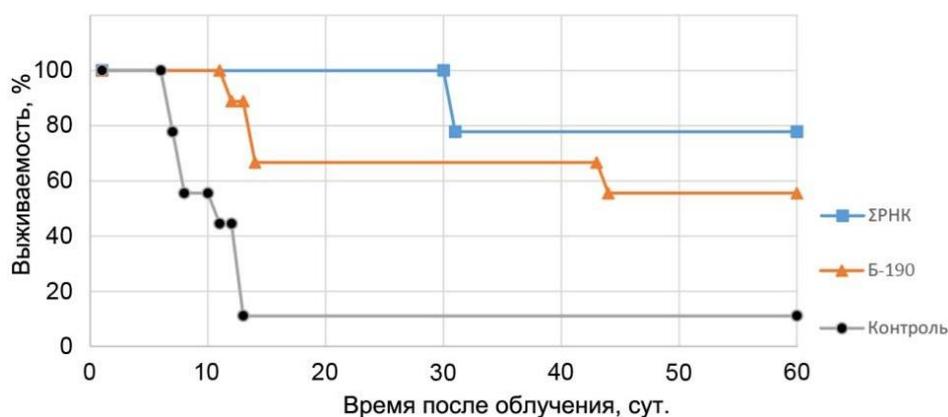


Рис. 44. Сравнение радиопротекторного действия препарата Б-190 и препарата суммарной РНК по выживаемости животных после облучения дозой 9,4 Гр (n=9, p<0.05).

Трудноразрешимым вопросом является вопрос о том, являются ли сходными или принципиально различаются системы-мишени, на которые воздействует препарат суммарной РНК и Б-190. Если оба эффективных препарата имеют различный механизм и различные мишени радиозащитного действия, то их объединение в один препарат или одну терапевтическую схему может существенно повысить эффективность защиты за счет расширения защитного арсенала организма. Если же они имеют одну и ту же мишень для проявления радиозащитного действия, то их объединение в один препарат или терапевтическую схему может мультиплицировать защитный эффект мишени и также может повысить эффективность защиты от лучевого поражения.

При разработке плана эксперимента в наших рассуждения мы предположили следующее. Если для Б-190 так же, как и для РНК, мишенью радиопротекторного действия являются стволовые клетки костного мозга, которые за счет индуцированной гипоксии избегают разрушения системой свободных радикалов и их производных, то в селезенке так же, как и в случае с РНК, будут обнаружены очаги пролиферации лейкоцитов, являющихся потомками

спасенных стволовых клеток крови, мигрировавших из костного мозга. Второй возможный вариант заключается в том, что при индуцированной гипоксии в принципе не происходит разрушения клеток и селезеночные и другие лимфоциты сохраняют свою жизнеспособность. Мы предположили, что если механизмы спасения связаны с селезенкой как органом, то при анализе патоморфологических имиджей, по общей структуре паренхимы селезенки можно будет отличить указанные варианты протекции.

Был проведен патоморфологический анализ селезенок мышей, взятых из групп суммарной РНК и Б-190. Ткани и органы забирались на 11 сутки после проведенного облучения в абсолютно летальной дозе 9.4 Гр. Результаты микроскопического и электронно-микроскопического анализа приведены на **рисунке 45**.

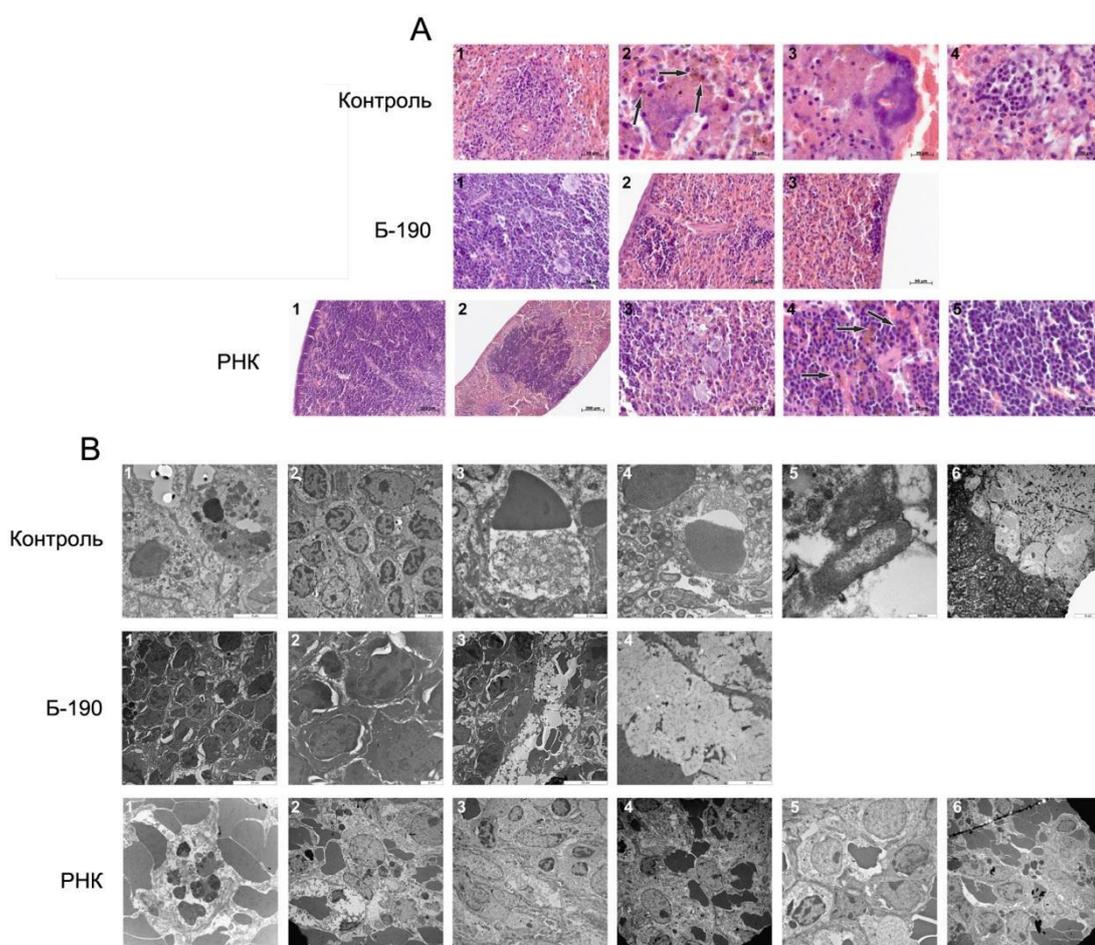


Рис. 45. Патоморфологический анализ состояния селезенок мышей, получавших суммарную РНК и Б-190 за 30 минут до облучения в дозе 9.4 Гр. А) Световая микроскопия. *Контроль*: 1 – лимфатический фолликул редуцирован до периартериальной зоны, 2 – множество сидерофагов на фоне лизированных эритроцитов, 3 – бактериальное скопление, 4 – островок кроветворения в красной пульпе. *Б-190*: 1 – паренхима селезенки плотно заполнена бластными элементами кроветворения, лимфоидные фолликулы отсутствуют, в большом количестве определяются мегакариоциты, 2 – субкапсулярное расположение островка кроветворения, 3 – скопление бластных кроветворных элементов под капсулой органа. *РНК*: 1 – выраженная редукция фолликулов белой пульпы, субкапсулярная концентрация бластных кроветворных клеток – плотный слой по контуру среза слева, 2 – крупное скопление бластных элементов в центральной части паренхимы, 3 – группа мегакариоцитов, 4 – многочисленные сидерофаги среди бластных элементов, 5 – молодые клетки лимфопоэза. В) Электронная микроскопия. *Контроль*: 1 – локус апоптоза, слева – одна из бластных кроветворных клеток, 2 – островок кроветворения, бластные клетки сплошным слоем; полиморфизм, как отражение разных направлений дифференцировки, 3 – фрагмент цитоплазмы

разрушенного эндотелия в просвете кровеносного капилляра, 4 – обилие бактерий в сосудах и строме селезенки, 5 – одна из бактерий крупным планом, 6 – в центре бактериальной ассоциации – обилие светлого мелкозернистого вещества с фибриллоподобными включениями (на микроснимке вверху справа). *Б-190*: 1 – обзорный снимок, бластные кроветворные клетки сплошь в поле зрения, 2 – бластные элементы кроветворения в паренхиме селезенки крупным планом, 3 – скопления оптически светлого вещества в паренхиме селезенки, 4 – хлопьевидное вещество крупным планом. *РНК*: 1 – апоптоз клеток стромы, 2 – проэритробласт (вверху справа) с большим количеством рибосом, что вызывает более темное окрашивание цитоплазмы, ядро с крупным округлым ядрышком, хорошо развитый аппарат Гольджи и крупные круглые митохондрии типичны для этого типа клеток, 3 – показаны ретикулярные клетки, характеризующиеся своими крупными овальными ядрами, округлыми ядрышками, скудной цитоплазмой, небольшими округлыми митохондриями и слабо развитой эндоплазматической сетью, 4 – предшественник мегакариоцита характеризуется наличием гранул, хорошо выраженными цистернами эндоплазматической сети и аппарата Гольджи, 5 – два предшественника эритроцитов, наиболее вероятно гемоцитобласты (вверху), 6 – два плазмоцита в центре снимка и апоптоз клеток.

В селезенке мышей контрольной группы наблюдались только отдельные бластные клетки, лежащие небольшими островками среди сохранившихся клеток стромы. При этом эндотелий значительной части кровеносных капилляров был дистрофически изменен или разрушен. Внутри сосудов и в строме присутствовали скопления бактерий. Фагоцитарной реакции клеточных элементов стромы не отмечалось.

У животных опытных групп в селезенке отмечено большое количество эритроидных клеток, как в просвете сосудов, так и в паренхиме, при этом значительную часть их составляли молодые клетки кроветворной ткани, располагавшиеся в виде различного размера колоний. Таким образом, в опытных группах в селезенке наблюдалась картина экстрамедуллярного гемопоэза с образованием колоний кроветворных клеток, большинство из которых являлись предшественниками эритропоэза.

В отличие от мышей, профилактически получавших препарат Б-190, в группе животных, пролеченных препаратом суммарной РНК, присутствовала выраженная пролиферация клеток лимфоцитарного ростка и отдельные клетки-предшественники или небольшие колонии клеток других ростков гемопоэза. В селезенке мышей, получавших препарат суммарной РНК присутствовали бластные клетки-предшественники миело- и лимфопоэза, многочисленные мегакариоциты. Предшественники лимфоцитов были преобладающим типом клеток в большей части полей наблюдения при электронно-микроскопическом исследовании. Кроме того, среди мезенхимальных клеток были идентифицированы мелкие группы клеток-предшественников гранулопоэза. Одновременно наблюдалась стимуляция фагоцитоза клетками стромы и увеличение васкуляризации органа.

Полученные результаты в большей мере предполагают, что два препарата обладают различными механизмами радиозащитного действия. В случае Б-190 защищаются клетки эритроидного ростка кроветворения. В случае препарата РНК и эритроидный, и лимфоидный росток кроветворения сохраняют свой функциональный потенциал.

3.18. Общее заключение по исследованию

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что молекулы дцРНК участвуют в индуцированных γ -облучением репаративных событиях, происходящих при взаимодействии дцРНК и ГСК. В работе экспериментально подтверждены все основные положения модели механизма радиопротекторного действия препарата дцРНК, выделенной из суммарной РНК *S. cerevisiae*, а именно:

1. дцРНК не деградирует в кровеносном русле экспериментальных мышей.
2. Не деградированные фрагменты дцРНК достигают специфических отделов костного мозга, интернализуются низкодифференцированными гемопозитическими предшественниками (c-Kit+/CD34+) естественным, природным механизмом и депонируют во внутренних компартментах клеток этих типов. Интернализация фрагментов дцРНК во внутренние компартменты ГСК сопровождается спасением гемопозитических предшественников от γ -радиации, активацией пролиферации и мобилизацией спасенных стволовых клеток.
3. Сохранившие жизнеспособность, мобилизованные гемопозитические предшественники фиксируются в паренхиме селезенки, где формируют герминативные центры пролиферации, или механизмом «хоуминга» возвращаются в костный мозг, где образуют новые костномозговые ниши.

В результате указанных событий формируется новая кроветворная и иммунная системы животных, разрушенные абсолютно летальной дозой облучения. Экспериментальные мыши выживают и продолжают жить до своей естественной смерти.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Радиозащитные свойства препарата РНК определяются присутствием в нем двуцепочечной формы РНК молекул

В доступной литературе практически отсутствует информация о радиопротекторном действии нуклеиновых кислот. Ранее в ряде работ сообщалось о радиозащитных свойствах дрожжевой РНК, однако, эти работы не получили дальнейшего развития. Вместе с тем, судя по имеющимся данным [Nikolin et al., 2017; Аликин и др., 1997; Ямковая и др., 2013], препараты РНК из дрожжей обладают широким спектром биологической активности, включая стимуляцию процессов регенерации, лейкопоэза, повышение активности иммунокомпетентных клеток. Введение препаратов дцРНК активирует процессы, участвующие в репарации пострадиационных повреждений. Считается, что эти свойства дцРНК, в первую очередь, связаны с их способностью индуцировать синтез и секрецию интерферона- γ различными иммунными клетками [Field, 1967]. Характерным свойством дцРНК является его мутагенная активность, которая обнаруживается как в отдельных экспериментах, так и прослеживается при анализе клеточных патологических изменений в ходе восстановления после высокодозового облучения.

В работе [Likhacheva et al., 2007 b] было показано, что фрагментированная дцДНК (препарат «Панаген» ЛСР № 004429/08 от 09.06.2008, ДНК мыши), введенная в организм смертельно облученных мышей, обладает выраженным радиопротекторным действием – ЛД_{100/30} составляет 70-90%. В работе было установлено, что экстраклеточная двуцепочечная ДНК доставляется в эмбриональные стволовые клетки человека.

В последних публикациях лаборатории описывается новое общебиологическое явление: способность низкодифференцированных клеток различной этиологии интернализировать экстраклеточную двуцепочечную ДНК естественным механизмом интернализации [Likhacheva et al., 2007 b; Долгова и др., 2009, 2014 a, b, c; Dolgova et al., 2012 b, 2013 b, 2014, 2015, 2016 a, b; Поттер и др., 2016 a, b, c, d; Potter et al. 2016, 2017; Ritter et al., 2022]. ГСК мыши также способны интернализировать экстраклеточные фрагменты. Было показано, что при внутривенном введении экстраклеточная двуцепочечная ДНК доставляется в клетки костного мозга, и в том числе в CD34⁺ предшественники, где депонируется и обнаруживается в течение 14 дней после введения [Dolgova et al., 2012 b; Долгова и др., 2014 b, c].

Охарактеризовав новое биологическое явление – способность примитивных гемопоэтических предшественников интернализировать фрагменты двуцепочечной ДНК естественным механизмом [Dolgova et al., 2013 b; Долгова и др., 2014 b, c; Ritter et al., 2022], было сделано предположение, что обнаруженный радиопротекторный эффект препарата ДНК связан с присутствием двуцепочечных фрагментов во внутреннем пространстве стволовых клеток крови. Находящиеся внутри стволовых клеток фрагменты двуцепочечной ДНК или являются

«щитом», принимая на себя действие свободных радикалов, образующихся в результате γ -атаки, или принимают участие в индуцированном γ -радиацией репаративном процессе восстановления ДЦР. Доставленные фрагменты или используются механизмом репарации в качестве внешней матрицы, или сами запускают дополнительный репаративный механизм, в результате чего меняется естественный ход репаративного процесса. То есть экстраклеточные фрагменты интерферируют идущий (действующий) репаративный процесс. Причем для терапевтических схем, описанных в наших публикациях, при процессе репарации межцепочечных сшивок такая интерференция приводит к разрушению стволовых инициирующих раковых клеток [Potter et al., 2016, 2017; Поттер и др., 2016 a, b, c, d] и эрадикации опухолевого графта, тогда как для репаративного процесса индуцированного γ -радиацией, наблюдается эффект спасения низкокодифференцированных гемопоэтических клеток, который определяется по большому числу развитых селезеночных колоний, детектируемых в селезенке на 9-12 сутки после летальных доз γ -радиации. Как показывает анализ, развитие селезеночных колоний коррелирует с высоким процентом выживания облученных животных. Именно этот факт явился основой предположения, что фрагменты двуцепочечной ДНК спасают гемопоэтические прогениторные клетки, которые мигрируют на периферию, фиксируются в селезенке и дают начало новой кроветворной и иммунной системам мышинного организма, разрушенным высокодозовой γ -радиацией.

Анализируя радиопротекторное действие суммарной РНК пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, было установлено, что различные препараты РНК обладают радиопротекторной защитой различной эффективности. В отдельных экспериментах показано, что РНК обладает пролонгированным радиопротекторным действием. При облучении экспериментальных мышей после введения препарата РНК за один час до облучения и на 4 сутки после инъекций препарата РНК выживают 100%, а на 8 и 12 сутки после инъекций препарата РНК – до 60% животных.

Было сделано предположение, что суть радиопротекторного эффекта связана с присутствием неизвестных примесей в различных препаратах РНК. Поскольку было известно, что двуцепочечная форма нуклеиновых кислот, а именно ДНК различных организмов, отвечает за радиопротекторный эффект, детектируемый в многочисленных экспериментах, предположили, что за радиопротекторный эффект отвечает присутствующая в препаратах суммарной РНК *S. cerevisiae* двуцепочечная фракция нуклеиновых кислот.

Хроматографией на гидроксиапатите была выделена фракция препарата РНК, элюирующаяся с колонки как двуцепочечная форма нуклеиновых кислот. Проведенные биологические тесты на радиопротекторные свойства обеих фракций однозначно свидетельствовали, что за радиопротекторный эффект препаратов РНК дрожжей отвечает двуцепочечная форма нуклеиновых кислот, составляющая ~1.0% от суммарно РНК препарата,

находящегося в работе. При этом эффективная доза ЛД_{100/30} для суммарного препарата составляла ~7 мг/мышь, тогда как та же эффективная доза для двуцепочечной формы составляла 160 мкг/мышь, что в ~40 раз меньше. В многократных экспериментах показано, что введение препарата двуцепочечной нуклеиновой кислоты за 60-30 минут до облучения полностью купирует радиационное действие γ -потока. Выживают 80%-100% экспериментальных мышей.

Используя метод дифференцированного гидролиза щелочью и кислотой и специфическое качественное окрашивание на присутствие ДНК/РНК, было установлено, что двуцепочечная форма, выделяемая в составе препаратов РНК обладающая радиопротекторными свойствами, представляет собой двуцепочечную РНК.

Фрагменты двуцепочечной РНК, переведенные в форму кДНК, были клонированы и секвенированы. Было установлено, что смесь фрагментов двуцепочечной РНК гетерогенна по первичной структуре и, по-видимому, для осуществления радиопротекторного действия не требуется специфической последовательности [Риттер и др., 2020]. Опираясь на эксперименты с использованием препаратов ДНК и препаратов двуцепочечной РНК, мы считаем, что за радиопротекторные свойства нуклеиновых кислот отвечает двуцепочечная форма молекул. Анализ радиопротекторного действия фракции одноцепочечной РНК свидетельствовал, что чистая одноцепочечная форма РНК не обладает радиопротекторным действием. Экспериментально установлено, что только «открытая» молекула дцРНК обладает радиозащитным действием.

4.2. Определение клеток-мишеней, ответственных за радиопротекторные свойства двуцепочечной РНК

Проведенный анализ изменений показателей крови на протяжении 37 суток после введения мышам препаратов РНК и облучения сублетальной дозой γ -радиации (8 Гр) свидетельствовал, что основное воздействие препараты РНК оказывают на кроветворные ростки костного мозга. Создается длительное напряженное пролиферативное состояние гемопоэтических ростков, следствием которого является появление в кровеносном русле ранних гемопоэтических предшественников.

Этот факт хорошо согласовался с результатами проведенного микроскопического анализа. Используя искусственно созданную молекулу дцРНК, меченную FAM флуорохромом, были охарактеризованы специфически меченные клетки костного мозга мышей. Оказалось, что меченый материал определяется во внутренних компартментах c-Kit⁺/CD34⁺ примитивных и мультипотентных гемопоэтических клеток. Более того обработка клеток костного мозга препаратом дцРНК индуцировала колониобразование и пролиферацию предшественников.

Основным отвечающим кроветворным ростком оказался гранулоцитарно-макрофагальный росток.

И наконец, в последней серии экспериментов была оценена способность препарата дцРНК индуцировать развитие селезеночных колоний. Полученные результаты находились в согласии с данными микроскопического анализа и анализа колониестимуляции и прямо свидетельствовали, что воздействие препарата дцРНК идет непосредственно на гемопоэтические низкокодифференцированные клетки, которые после мобилизации фиксируются в паренхиме селезенки, где формируют селезеночные колонии и дают импульс к развитию новой кроветворной и иммунной систем, разрушенных абсолютно летальной дозой радиации.

Совокупность полученных результатов свидетельствовала, что радиозащитные свойства препарата дцРНК связаны с воздействием на ранние гемопоэтические предшественники, поврежденные в результате воздействия жесткого ионизирующего излучения.

4.3. Модель механизма радиопротекторного действия препарата фрагментированной дцРНК, выделенной из препарата суммарной РНК *S. cerevisiae*

Полученные результаты явились основой создания модели механизма радиопротекторного действия препарата фрагментированной дцРНК, выделенной из препарата суммарной РНК *S. cerevisiae*. Были выделены основные положения:

1. дцРНК при внутривенном введении не деградирует в кровеносном русле экспериментальных мышей.
2. Не деградированные фрагменты дцРНК достигают специфических отделов костного мозга, интернализуются низкокодифференцированными гемопоэтическими предшественниками и мультипотентными прогениторами (c-Kit/CD34) естественным природным механизмом и депонируют во внутренних компартментах клеток этих типов.
3. После летального облучения депонированные фрагменты принимают участие в процессах репарации прямых и сложных ДЦР, индуцированных летальной дозой радиации.
4. Одновременно происходит активация пролиферации спасенных стволовых клеток. Спасенные ГСК с корректно восстановленной ДНК мобилизуются в кровяное русло и, 1) фиксируются в селезенке, где образуют герминативные центры пролиферации форменных элементов крови; 2) механизмом «хоуминга» возвращаются в костный мозг, где образуют новые костномозговые ниши.

В результате указанных событий формируется новая кроветворная и иммунная системы, разрушенные абсолютно летальной дозой облучения. Экспериментальные мыши выживают и продолжают жить до своей естественной смерти. Вся дальнейшая экспериментальная работа была направлена на доказательство положений модели.

Было доказано, что дцРНК не деградирует в кровеносном русле экспериментальных животных. Также молекулы дцРНК сохраняют свою нативную структуру при экспозиции с плазмой крови человека. Эти эксперименты и имеющиеся литературные данные [Ritter et al., 2023] свидетельствуют, что в плазме крови отсутствуют нуклеазы, способные деградировать молекулы дцРНК.

Основополагающим для всей работы явилась часть исследования, где в прямом эксперименте доказан факт интернализации молекул дцРНК в низкодифференцированные эукариотические клетки и экстраполяция результатов этой части исследования на ГСК. Идея подхода заключалась в том, что одну и ту же молекулу дцРНК метили флуорохромом и радиоактивной меткой. После чего таким препаратом дцРНК обрабатывали популяцию клеток, в которой присутствовали низкодифференцированные (стволовые) клетки, которые согласно микроскопическому анализу захватывали меченный флуорохромом материал и депонировали его во внутриклеточных компартментах. Популяцию клеток сортировали по признаку FAM+/FAM-. Клетки лизировали тризолом и материал РНК анализировали гель-электорофорезом и автордиографически. Оказалось, что радиоактивный материал содержал только FAM+ клетки, и что этот материал представляет собой исходную дцРНК молекулу, которой обрабатывался исходный образец клеток. Полученный результат возможен только в том случае, если интернализировалась исходная нативная молекула дцРНК, одновременно несущая и FAM, и P³² метку.

Полученный результат привел в логическое соответствие материалы по воздействию дцРНК на гемопоэтические предшественники, полученные в экспериментах по: оценке воздействия дцРНК на гемопоэтические ростки; по локализации FAM-дцРНК в низкодифференцированных гемопоэтических клетках; по стимуляции колониеобразования и пролиферативной активности предшественников; по индукции образования селезеночных колоний. В одновременном рассмотрении всей совокупности полученных результатов стало очевидным, что дцРНК доставляется во внутренние компартменты ГСК, депонируется в них и становится участником процесса репарации повреждений ДНК, индуцированных воздействием летальной дозы γ -радиации.

Используя новую информацию по интернализации дцРНК в ГСК были проведены эксперименты по определению критического органа «хоумнга» мобилизованных в кровяное русло ГСК. Имитируя условия мобилизации, меченные радиоактивным фосфором клетки костного мозга (читай ГСК) были реинфузированы в кровяное русло экспериментальных животных. Как и ожидалось, часть ГСК фиксировалась в паренхиме селезенки, другая часть возвращалась в костный мозг. Эти эксперименты прослеживали путь мобилизованных ГСК в

экспериментах по радиопротекции с использованием препарата дцРНК, приводящих к формированию селезеночных колоний.

4.4. Молекулярные механизмы радиопротекторного действия дцРНК

Как следует из литературных источников, одноцепочечная РНК может принимать участие в репарации ДЦР, мимикрирующих разрывы, вызванные γ -радиацией, при ее искусственной трансфекции. Описан процесс репарации, в котором может принимать участие комплекс Rad51/Ago2/малые одноцепочечные РНК, когда происходит внедрение комплекса Rad51/Ago2/малая одноцепочечная РНК между цепями разорванных цепей ДНК и следующее за этим комплиментарное спаривание за счет микрогомологий между одноцепочечной РНК и добавочной к месту разрыва ДНК [Gao et al., 2014; Bader et al., 2020; Qi Z, et al., 2015]. Возможно, что одноцепочечная РНК и обладает радиозащитным эффектом, однако мы не смогли обнаружить достоверную доставку одноцепочечной искусственной РНК в клетки костного мозга естественным природным механизмом. На наш взгляд, именно этот факт является причиной отсутствия радиозащитного действия у препаратов одноцепочечной РНК. Тем не менее, двуцепочечная форма молекулы РНК внутри клетки всегда может превратиться в одноцепочечный субстрат. И тогда объяснение радиопротекторных свойств может состоять в том, что; 1) двуцепочечная форма молекулы РНК попадает внутрь стволовых клеток костного мозга; 2) внутри клетки происходит распаривание ее цепей и формирование микрогомологии уже одноцепочечной РНК с участками двуцепочечных концов разорванной хромосомы. Восстановление ДНК происходит вследствие синтеза по матрице и последующего репаративного лигирования [Qi Z et al., 2015; Dutta et al., 2017].

В литературном обзоре были рассмотрены варианты репаративных процессов с использованием РНК матрицы. Описаны модели, в которых основным лейтмотивом является построение кДНК копии и вовлечение двуцепочечной формы этой нуклеиновой кислоты в репаративный процесс [Storici et al., 2007; Meers, Keskin and Storici, 2016; Qi Z et al., 2015]. Для двуцепочечной ДНК также охарактеризованы различные модели репарации с привлечением внешней двуцепочечной матрицы [Leung et al., 1997; Li et al., 2001; Bärtsch et al., 2000; Symington, 2005]. Характерным для участия таких нуклеиновых кислот в идущем репаративном процессе является внедрение процессированного 3'ОН конца разорванной ДНК между цепей внешней матрицы и формирования интермедиата репарации. Далее могут осуществляться различные описанные варианты достраивания цепей и восстановления целостности ДНК. Можно предположить, что репарация в присутствии экстраклеточных двуцепочечных РНК идет именно по такому общему молекулярному сценарию. О том, что двуцепочечная форма нуклеиновых кислот важна для осуществления репаративного процесса, свидетельствуют данные, полученные

в работе [Storici et al., 2007], где показано, что дуплекс РНК/ДНК повышает эффективность репарации по сравнению с одноцепочечной РНК на 2-3 порядка. Возможно, что в процессе поиска гомологии между фрагментами экстраклеточной дцРНК и клеточной ДНК осуществляется принцип «молекулярной коммутации», описанный в работе [Nikitin, 2023]. В этой модели первично случайные взаимодействия между молекулами нуклеиновых кислот могут приводить к образованию стабильных комплексов, в которых один некомплементарный фрагмент через посредника передает генетическую информацию некомплементарному фрагменту хроматина.

Как было сказано выше, в наших исследованиях мы не смогли увидеть интернализацию одноцепочечной РНК в клетки костного мозга. Этот факт, а также отсутствие радиозащитного действия у препарата одноцепочечной РНК, предполагают, что радиопротекторное действие дцРНК связано с появившейся в клеточном пространстве ГСК внехромосомной двуцепочечной матрицы. Внедрение между цепями такой матрицы процессированного филамента ДНК ДЦР может являться главным событием, определяющим дальнейшие фазы репарации фатального повреждения, индуцированного γ -радиацией (**Рисунок 46А**). При этом принципиальным является образование дцРНК микрогомологии с ДНК поврежденного участка или реализации принципа «молекулярной коммутации».

Такой предполагаемый механизм репарации разрывов, индуцированных γ -лучами, очень хорошо объясняет эксперименты по радиопротекции препаратом двуцепочечной РНК после «Денатурации-Ренатурации» и обработок панкреатической РНКазой А.

Мы также предполагаем, что депонированные в ядре фрагменты экстраклеточной дцРНК принимают участие в репарации межцепочечных сшивок в фазе эксцизионной репарации, что также приводит к восстановлению поврежденной ДНК и сохранению корректного хромосомного континуума (**Рисунок 46Б**).

Помимо предполагаемого нами спасения ГСК в результате интерференции процесса репарации ДЦР, идущего в делящихся ГСК, возможны другие варианты сохранения жизнеспособности гемопоэтических прогениторов. Это может быть, например, участие дцРНК в купировании стрессового состояния, описанного для ангиогенина [Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011; Prehn and Jirström, 2020; Pizzo et al., 2013]. Также дцРНК, попавшая в стволовые клетки, может быть триггером синтеза и секреции ИЛ-1, ИЛ-8, участвующих в процессах спасения стволовых клеток после облучения [Peveri et al., 1988; Strieter et al., 1988; Kwon et al., 1994; Wanninger et al., 2009; French et al., 2018; Kuckleburg and Newman, 2013; Laterveer et al., 1995; Ha, Debnath, and Neamati, 2017]. Также возможны антиоксидантные реакции, индуцированные дцРНК, связанные с системой тромбоспондина [Roberts, Kaur, and Isenberg, 2017; Maxhimer et al., 2009; Wardman et al., 2007; Miller et al., 2015; Meijles et al., 2017]. Описана роль малых РНК в индукции репаративных процессов ДЦР путем привлечения РНК-связывающих репаративных белков [Алемасова и Лаврик, 2017]. Несмотря на возможные перечисленные варианты сохраняющих механизмов, можно с достаточной долей уверенности считать, что именно спасение C-Kit⁺/CD34⁺ клеток, в результате интернализации ими фрагментов экстраклеточной дцРНК, является условием радиозащитного действия препарата дцРНК.

Таким образом, данные молекулярно-биологических исследований, экспериментов с использованием клеточных технологий и биологические тесты свидетельствуют, что субстанцией, определяющей радиопротекторное действие, является дцРНК дрожжей *S. cerevisiae*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная модель механизма радиопротекторного действия дцРНК на настоящий момент времени выглядит следующим образом. Фрагменты экстраклеточных дцРНК интернализуются ГСК за счет нового, до конца не охарактеризованного механизма. Или за счет простого экранирования продуктов перекисного окисления, образованных γ -радиацией, или, в более сложном варианте, за счет участия в репарации повреждений ДНК, эти фрагменты способствуют или сохранению, или корректному восстановлению поврежденного хромосомного континуума. В результате стволовые клетки сохраняют жизнеспособность после летальной дозы γ -радиации. Далее происходит мобилизация выживших стволовых клеток в кровоток и их фиксация в селезенке, где формируется пул клеток, являющихся источником восстановления иммунной и кроветворной систем организма. Мыши выживают и продолжают жить до своей естественной смерти.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что препарат РНК пекарских дрожжей *S. cerevisiae* обладает экстренным (100% выживаемость при введении за 30-60 минут до облучения) и пролонгированным (60% выживаемость при введении за 12 суток до облучения) радиопротекторным действием.
2. Установлено, что активной субстанцией препарата дрожжевой РНК, определяющей ее радиопротекторные свойства, является фракция двуцепочечной РНК, присутствующая в исходном препарате суммарной РНК. Для достижения полного радиозащитного эффекта требуется 160 мкг дцРНК на мышь (≈ 7 мг/кг). Для проявления радиопротекторных свойств первичная последовательность молекул РНК значения не имеет. Определяющим является двуцепочечная форма и открытая конформация двуцепочечных концов.
3. Изучены особенности радиопротекторного механизма препарата дцРНК. Установлено, что:
 - дцРНК не деградирует в кровеносном русле экспериментальных животных в течение минимум 1 часа.
 - основной мишенью радиопротекторного действия препарата дцРНК является ГСК и ее ранние мультипотентные потомки. Низкодифференцированные клетки, в частности c-Kit/CD34 ГСК, способны интернализировать дцРНК природным эндоцитозом, идущим по клатрин/кавеолин-зависимому типу с использованием энергии АТФ. В результате интернализации дцРНК попадает в клетку, где она депонируется во внутриклеточных компартментах.

- депонированные во внутренних компартментах ГСК фрагменты дцРНК участвуют во внутриклеточных событиях таким образом, что клетки, облучённые летальной дозой γ -радиации, сохраняют свою жизнеспособность.
 - спасённые ГСК мобилизуются в кровотоки и фиксируются в селезенке или возвращаются в костный мозг (хоуминг ГСК). В селезенках образуются герминативные центры пролиферации, создавая основу восстановления иммунной и кроветворной системы смертельно облученных мышей. Выжившие животные в течение 3 месяцев полностью седеют, при этом продолжительность жизни животных сопоставима с продолжительностью жизни интактных мышей.
4. Показано, что радиозащитное действие препарата дцРНК по эффективности не уступает штатному радиопротектору Б-190.

Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории индуцированных клеточных процессов ИЦиГ СО РАН за помощь в организации экспериментальных работ и обсуждении полученных результатов. Также автор выражает благодарность Николину В.П. и Поповой Н.А. за исходный посыл в выполнении данного исследования, Дубатовой Т.Д. за помощь в оценке состояния клеток костного мозга, Таранову О.С. за помощь в гистологическом анализе селезенок мышей, Байбородину С.И. за помощь в оценке результатов конфокальных экспериментов, Ефремову Я.Р. за помощь в оценке результатов FACS анализа. Кроме того, автор выражает свою глубокую благодарность Мещаниновой М.И. и Веняминовой А.Г. за создание структуры и синтез синтетической молекулы РНК, без чего большая часть представленной работы не могла быть выполнена, а также Сеницыной О.И. и Шевченко А.И. за существенные профессиональные замечания, позволившие улучшить работу на стадии написания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алемасова Е. Э., Лаврик О. И. На стыке трех нуклеиновых кислот: роль РНК-связывающих белков и поли (ADP-рибозы) в репарации ДНК // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2017. – Т. 9. – №. 2 (33). – С. 4-17.
2. Аликин Ю.С. и др. Индуктор интерферона ридостин / Патент № 2083221. Заявл. 12.01.1993. Оpubл. 10.07.1997.
3. Вернигорова Л. А., Чертков К. С., Крылов К. П. Химия, фармакология и механизмы действия противолучевых средств: Тез. докл. IV всесоюз. конф., 23-25 окт. 1990 г. / Науч. редакторы Давыдова С. А. и др., Москва: Мир, 1990. 186 с.
4. Гуськова А.К., Байсоголов Г.Д. Лучевая болезнь человека. – М.: Медицина, 1971. – 382 с.
5. Гуськова А.К. и др. Острые эффекты облучения у пострадавших при аварии на Чернобыльской АЭС // Мед. радиология. – 1987. – Т. 32. – № 12. – С. 3–17.
6. Долгова Е. В. и др. Лейкостимулирующее действие фрагментов экзогенной ДНК, защищенных протамином, при вызванной циклофосфаном миелосупрессии мышей // Вопросы Онкологии. 2009. № 6 (55). С. 761–764.
7. Долгова Е. В. и др. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014 (а). № 2 (16). С. 397–414.
8. Долгова Е. В. и др. Паталогические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014 (b). № 1 (17). С. 129–146.
9. Долгова Е. В. и др. Характеристика изменения количества умеренных повторов в геноме клеток костного мозга экспериментальных мышей на фоне инъекции циклофосфана и экзогенной ДНК человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014 (с). № 2 (17). С. 246–264.
10. Ильин Л.А., Соловьев В.Ю. Непосредственные медицинские последствия радиационных инцидентов на территории бывшего СССР // Мед. радиология и рад. безопасность. – 2004. – Т. 49. – № 6. – С. 37–48.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук, Москва: Мир, 1984. 479 с.
12. Николин В. П. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопросы онкологии. 2006. №. 3 (52). С. 336–340.
13. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
14. Озеров И. В., Осипов А. Н. Кинетическая модель репарации двуниевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при действии редкоизирующего излучения с различной мощностью дозы // Компьютерные исследования и моделирование. 2015. №. 1 (7). С. 159–176.
15. Поттер Е. А. и др. Терапевтические эффекты воздействия циклофосфана, препаратов двуцепочечной ДНК и их сочетания на раковые клетки асцита Кребс-2 и различные формы трансплантатов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016 (а). № 1 (20). С. 96–107.
16. Поттер Е. А. и др. Характеристика режимов терапевтического воздействия циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК на опухоль Кребс-2, растущую в асцитной форме, приводящих к эрадикации первичного асцита // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016 (b). № 1 (20). С. 108–124.
17. Поттер Е. А. и др. Режим однократной инъекции препарата двуцепочечной ДНК после каждой инъекции циклофосфана, приводящий к эрадикации первичного асцита Кребс-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016 (с). № 5 (20). С. 716–722.
18. Поттер Е. А. и др. Разработка регламента терапевтического режима, основанного на синергичном действии циклофосфана и препаратов двуцепочечной ДНК, приводящего к полному вылечиванию экспериментальных животных от асцитной формы опухоли мышцы Кребс-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016 (d). № 5 (20). С. 723–735.

19. Риттер Г.С. и др. Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 6. – С. 643.
20. Селидовкин Г. Д. и др. Острая лучевая болезнь. В: Ильин ЛА, редактор. Радиационные поражения человека. – М.: ИздАТ, 2001. – Т. 2. – С. 62–107.
21. Харамоненко С. С., Ракитянская А. А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии // Минск: Беларусь. – 1974. – Т. 135.
22. Челобанов Б. П., Лактионов П. П., Власов В. В. Белки, участвующие в связывании и поглощении клетками нуклеиновых кислот (обзор) // Биохимия. 2006. № 6 (71).
23. Чинак О. А. и др. Проникновение пептида лактапина в раковые клетки человека // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – №. 4. – С. 401-401.
24. Шапиро Д. К. (род 1921) Практикум по биологической химии: Учеб. пособие для биол. специальностей пединститутов / Д.К.Шапиро. - 2-е изд., перераб. и доп. - Мн. : Выш. шк., 1976.
25. Alvarez-Gonzalez R. and Althaus F. R. Poly (ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents // Mutation Research/DNA Repair. – 1989. – Т. 218. – №. 2. – С. 67-74.
26. Amyere M. et al. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis // International Journal of Medical Microbiology. 2001. № 6 (291). С. 487–494.
27. Anker P. et al. The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response // Journal of Immunogenetics. 1980. № 6 (7). С. 475–481.
28. Ayares D. et al. Sequence homology requirements for intermolecular recombination in mammalian cells. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986. № 14 (83). С. 5199–5203.
29. Bader A. S. et al. The roles of RNA in DNA double-strand break repair // British journal of cancer. 2020. № 5 (122). С. 613–623.
30. Bakkenist C. J., Kastan M. B. Chromatin perturbations during the DNA damage response in higher eukaryotes // DNA Repair. 2015. (36). С. 8–12.
31. Baranov A.E. et al. Chernobyl experience: biological indicators of exposure of ionizing radiation. Stem Cells. Murphy M.J., Ed., 13(1), 1995.
32. Baranov A.E. et al. Use of blood cell count changes after radiation exposure in dose assessment and evaluation of bone marrow function. In: The Medical Basis for Radiation Accident Preparedness. Ricks R.C, Fry S.A., Eds., Elsevier Science, New York, 1990.
33. Bärtsch S., Kang L. E., Symington L. S. RAD51 Is Required for the Repair of Plasmid Double-Stranded DNA Gaps from Either Plasmid or Chromosomal Templates // Molecular and Cellular Biology. 2000. № 4 (20). С. 1194–1205.
34. Bennett C. B. et al. Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1993. № 12 (90). С. 5613–5617.
35. Bergonié J., Tribondeau L. Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. 1906. // The Yale Journal of Biology and Medicine. 2003. № 4–6 (76). С. 181–182.
36. Bergsmedh A. et al. Loss of the p21Cip1/Waf1 Cyclin Kinase Inhibitor Results in Propagation of Horizontally Transferred DNA1 // Cancer Research. 2002. № 2 (62). С. 575–579.
37. Bertheloot D. et al. RAGE enhances TLR responses through binding and internalization of RNA // The Journal of Immunology. 2016. №. 10 (197). С. 4118–4126.
38. Boggs D. R. The total marrow mass of the mouse: A simplified method of measurement // American Journal of Hematology. 1984. № 3 (16). С. 277–286.
39. Budker V. et al. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process // The Journal of Gene Medicine. 2000. № 2 (2). С. 76–88.
40. Burdelya L. G. et al. An Agonist of Toll-Like Receptor 5 Has Radioprotective Activity in Mouse and Primate Models // Science. 2008. № 5873 (320). С. 226–230.
41. Cahilog Z. et al. The role of neutrophil NETosis in organ injury: novel inflammatory cell death mechanisms // Inflammation. 2020. №. 6 (43). С. 2021–2032.

42. Chen Y. et al. Radioprotective Effects of Heat-Killed Mycobacterium Tuberculosis in Cultured Cells and Radiosensitive Tissues // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016. № 3–4 (40). C. 716–726.
43. Choi J. S., Mahadik B. P., Harley B. A. C. Engineering the hematopoietic stem cell niche: *Frontiers in biomaterial science // Biotechnology Journal*. 2015. № 10 (10). C. 1529–1545.
44. Cole L. J., Bond V. P., Fishler M. C. Preprotection of Mice against X-Irradiation Mortality by Sodium Nitrite // *Science*. 1952. № 2998 (115). C. 644–646.
45. Crisp M. et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex // *Journal of Cell Biology*. 2005. № 1 (172). C. 41–53.
46. Deng C., Capecchi M. R. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus // *Molecular and Cellular Biology*. 1992. № 8 (12). C. 3365–3371.
47. Dent P. et al. Stress and Radiation-Induced Activation of Multiple Intracellular Signaling Pathways1 // *Radiation Research*. 2003. № 3 (159). C. 283–300.
48. Diesbach P. de et al. Identification, purification and partial characterisation of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells // *Nucleic Acids Research*. 2000. № 4 (28). C. 868–874.
49. Dolgova E. V. et al. “Delayed death” phenomenon: A synergistic action of cyclophosphamide and exogenous DNA // *Gene*. 2012 (a). № 2 (495). C. 134–145.
50. Dolgova E. V. et al. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2012 (b). № 6 (2). C. 440–452.
51. Dolgova E. V. et al. Pathological changes in mice treated with cyclophosphamide and exogenous DNA // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2013 (a). № 4 (3). C. 291–304.
52. Dolgova E. V. et al. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA // *Gene*. 2013 (b). № 2 (528). C. 74–83.
53. Dolgova E. V. et al. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination // *Cancer Biology & Therapy*. 2014. № 10 (15). C. 1378–1394.
54. Dolgova E. V. et al. Comparative analysis of pathologic processes developing in mice housed in SPF vs non-SPF conditions and treated with cyclophosphamide and dsDNA preparation // *Pathology - Research and Practice*. 2015. № 10 (211). C. 754–758.
55. Dolgova E. V. et al. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line // *Stem Cell Research & Therapy*. 2016 (a). № 1 (7). C. 76.
56. Dolgova E. V. et al. Nonadherent Spheres With Multiple Myeloma Surface Markers Contain Cells that Contribute to Sphere Formation and Are Capable of Internalizing Extracellular Double-Stranded DNA // *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2016 (b). № 10 (16). C. 563–576.
57. Dutta A. et al. Microhomology-mediated end joining is activated in irradiated human cells due to phosphorylation-dependent formation of the XRCC1 repair complex // *Nucleic Acids Research*. 2017. № 5 (45). C. 2585–2599.
58. Emara M. M. et al. Angiogenin-induced tRNA-derived Stress-induced RNAs Promote Stress-induced Stress Granule Assembly * // *Journal of Biological Chemistry*. 2010. № 14 (285). C. 10959–10968.
59. Field A. K. et al. Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-Ff-RNA) from *E. coli* infected with MS2 coliphage. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1967. № 5 (58). C. 2102–2108.
60. Filaci G. et al. Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes // *Gene Therapy*. 2004. № 1 (11). C. 42–51.
61. Francia S. et al. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response // *Nature*. – 2012. – T. 488. – №. 7410. – C. 231-235.
62. Frazier E. P. et al. Age-dependent regulation of skeletal muscle mitochondria by the thrombospondin-1 receptor CD47 // *Matrix Biology*. 2011. № 2 (30). C. 154–161.
63. Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases // *Annual Review of Biochemistry*. 1995. № 1 (64). C. 97–112.

64. Friesecke I. et al. Acute radiation exposure and early hematopoietic response pattern: an evaluation of the Chernobyl accident victims. *Int. J. Radiat. Med.*, 1, 55, 1999.
65. Gao M. et al. Ago2 facilitates Rad51 recruitment and DNA double-strand break repair by homologous recombination // *Cell research*. 2014. № 5 (24). C. 532–541.
66. García-Olmo D. C., Ruiz-Piqueras R., García-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue // *Histology and Histopathology*. 2004. № 2 (19). C. 575–583.
67. Goans R.E. et al. Early dose assessment in criticality accidents // *Health Phys.* 81. – 2001. – P. 446–449.
68. Gottlieb T. A. et al. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. // *Journal of Cell Biology*. 1993. № 3 (120). C. 695–710.
69. Gusev G., Guskova A.K., Mettler F.A., Eds. *Medical Management of Radiation Accidents*. London, New York, Washington DC: CRS Press; 2001.
70. H. Rashed M. et al. Exosomes: From Garbage Bins to Promising Therapeutic Targets // *International Journal of Molecular Sciences*. 2017. № 3 (18). C. 538.
71. Ha H., Debnath B., Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases // *Theranostics*. 2017. № 6 (7). C. 1543–1588.
72. Hanson W. R., Houseman K. A., Collins P. W. Radiation protection in vivo by prostaglandins and related compounds of the arachidonic acid cascade // *Pharmacology & Therapeutics*. 1988. № 1 (39). C. 347–356.
73. Hanss B. et al. Identification and characterization of a cell membrane nucleic acid channel // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. № 4 (95). C. 1921–1926.
74. Hastings P. J. et al. Ends-in vs. ends-out recombination in yeast. // *Genetics*. 1993. № 4 (135). C. 973–980.
75. Hefeneider S. H. et al. Identification of a Cell-Surface DNA Receptor and Its Association with Systemic Lupus Erythematosus // *Journal of Investigative Dermatology*. 1990. № 6, Supplement (94). C. s79–s84.
76. Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003. № 1 (532). C. 103–115.
77. Helleday T. et al. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment // *DNA Repair*. 2007. № 7 (6). C. 923–935.
78. Herz J., Strickland D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor // *The Journal of Clinical Investigation*. 2001. № 6 (108). C. 779–784.
79. Höfer T., Rodewald H.-R. Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways // *Blood*. 2018. № 11 (132). C. 1106–1113.
80. Holmgren L. et al. Horizontal Transfer of DNA by the Uptake of Apoptotic Bodies // *Blood*. 1999. № 11 (93). C. 3956–3963.
81. Ira G., Haber J. E. Characterization of RAD51-Independent Break-Induced Replication That Acts Preferentially with Short Homologous Sequences // *Molecular and Cellular Biology*. 2002. № 18 (22). C. 6384–6392.
82. Isenberg J. S. et al. Increasing Survival of Ischemic Tissue by Targeting CD47 // *Circulation Research*. 2007. № 5 (100). C. 712–720.
83. Isenberg J. S. et al. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies // *Nature Reviews Cancer*. 2009. № 3 (9). C. 182–194.
84. Ivanov P. et al. Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation // *Molecular Cell*. 2011. № 4 (43). C. 613–623.
85. Kaidi A., Jackson S. P. KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling // *Nature*. 2013. № 7452 (498). C. 70–74.
86. Kauffman W. B. et al. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides // *Trends in Biochemical Sciences*. 2015. № 12 (40). C. 749–764.
87. Keskin H. et al. Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair // *Nature*. 2014. № 7527 (515). C. 436–439.
88. Khalil I. A. et al. Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery // *Pharmacological Reviews*. 2006. № 1 (58). C. 32–45.

89. Kohzaki M. et al. Cooperative Roles of Vertebrate Fbh1 and Blm DNA Helicases in Avoidance of Crossovers during Recombination Initiated by Replication Fork Collapse // *Molecular and Cellular Biology*. 2007. № 8 (27). C. 2812–2820.
90. Kreimeyer A. et al. DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins // *Journal of Biological Chemistry*. – 1984. – T. 259. – №. 2. – C. 890-896.
91. Kucherlapati R. S. et al. Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984. № 10 (81). C. 3153–3157.
92. Kurkjian C. J. et al. The Toll-Like Receptor 2/6 Agonist, FSL-1 Lipopeptide, Therapeutically Mitigates Acute Radiation Syndrome // *Scientific Reports*. 2017. № 1 (7). C. 1–13.
93. Kwon O. J. et al. Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1994. № 4 (267). C. L398–L405.
94. Langston L. D., Symington L. S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 43 (101). C. 15392–15397.
95. Lans H., Marteijn J. A., Vermeulen W. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response // *Epigenetics & Chromatin*. 2012. № 1 (5). C. 4.
96. Laterveer L. et al. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability // *Blood*. 1995. № 8 (85). C. 2269–2275.
97. Lawen A. Apoptosis—an introduction // *BioEssays*. 2003. № 9 (25). C. 888–896.
98. Leal-Pinto E. et al. Presence of the nucleic acid channel in renal brush-border membranes: allosteric modulation by extracellular calcium // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005. № 1 (289). C. F97–F106.
99. Leung W.-Y., Malkova A., Haber J. E. Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. № 13 (94). C. 6851–6856.
100. Li J., Read L. R., Baker M. D. The Mechanism of Mammalian Gene Replacement Is Consistent with the Formation of Long Regions of Heteroduplex DNA Associated with Two Crossing-Over Events // *Molecular and Cellular Biology*. 2001. № 2 (21). C. 501–510.
101. Likhacheva A. S. et al. Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA // *Gene Ther Mol Biol*. 2007. №. 2 (11). C. 185–202.
102. Likhacheva A. S. et al. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose γ -radiation // *Gene Ther Mol Biol*. 2007. №. 2 (11). C. 305–314.
103. Lisby M. et al. Choreography of the DNA Damage Response: Spatiotemporal Relationships among Checkpoint and Repair Proteins // *Cell*. 2004. № 6 (118). C. 699–713.
104. Loke S. L. et al. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. № 10 (86). C. 3474–3478.
105. Lothe F., Devik F. The protective effect of cysteamine against roentgen ray injury on ears of rabbits irradiated under conditions of complete anoxia // *Acta Radiologica*. 1955. № 4 (44). C. 306–312.
106. Ludtke J. J. et al. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA // *Journal of Cell Science*. 1999. № 12 (112). C. 2033–2041.
107. MacPhail S. H. et al. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays // *International journal of radiation biology*. – 2003. – T. 79. – №. 5. – C. 351-359.
108. Mahajan K., Mahajan N. P. Cross talk of tyrosine kinases with the DNA damage signaling pathways // *Nucleic Acids Research*. 2015. № 22 (43). C. 10588–10601.
109. Maréchal A., Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013. №. 9 (5).
110. Maxhimer J. B. et al. Radioprotection in normal tissue and delayed tumor growth by blockade of CD47 signaling // *Science Translational Medicine*. 2009. № 3 (1). C. 3ra7-3ra7.

111. McLaughlin T.P. et al. A Review of Criticality Accidents. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 2000: 9–13.
112. McVey M., Lee S. E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings // Trends in Genetics. 2008. № 11 (24). C. 529–538.
113. Meers C., Keskin H., Storic F. DNA repair by RNA: Templated, or not templated, that is the question // DNA Repair. 2016. (44). C. 17–21.
114. Meijles D. N. et al. The matricellular protein TSP1 promotes human and mouse endothelial cell senescence through CD47 and Nox1 // Science Signaling. 2017. № 501 (10). C. 1784.
115. Meltser V., Ben-Yehoyada M., Shaul Y. c-Abl tyrosine kinase in the DNA damage response: cell death and more // Cell Death & Differentiation. 2011. № 1 (18). C. 2–4.
116. Menon V., Povirk L. F. End-processing nucleases and phosphodiesterases: An elite supporting cast for the non-homologous end joining pathway of DNA double-strand break repair // DNA Repair. 2016. (43). C. 57–68.
117. Miller T. W. et al. CD47 Receptor Globally Regulates Metabolic Pathways That Control Resistance to Ionizing Radiation * // Journal of Biological Chemistry. 2015. № 41 (290). C. 24858–24874.
118. Munkonge F. M. et al. Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy // Advanced Drug Delivery Reviews. 2003. № 6 (55). C. 749–760.
119. Nair C. K. K. et al. Mechanism of radioprotection by TMG, a water soluble vitamin E // Journal of radiation research. 1999. № 4 (40). C. 451.
120. Nair C. K. K., Parida D. K., Nomura T. Radioprotectors in Radiotherapy // Journal of Radiation Research. 2001. № 1 (42). C. 21–37.
121. Nakagawa K., Fujimoto K., Miyazawa T. β -Carotene as a high-potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism. 1996. № 1 (1299). C. 110–116.
122. Neta R. Role of cytokines in radioprotection // Pharmacology & Therapeutics. 1988. № 1 (39). C. 261–266.
123. Neta R. Cytokines in radioprotection and therapy of radiation injury // Biotherapy. 1989. № 1 (1). C. 41–45.
124. Neta R., Douches S., Oppenheim J. J. Interleukin 1 is a radioprotector. // The Journal of Immunology. 1986. № 7 (136). C. 2483–2485.
125. Nikitin M. P. Non-complementary strand commutation as a fundamental alternative for information processing by DNA and gene regulation // Nature Chemistry. 2023. C. 1-13.
126. Nikolin V. P. et al. Experimental Study of Yeast RNA Preparation as a Possible Radioprotective Agent for Radiotherapy of Malignant Tumors // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2017. № 5 (163). C. 639–642.
127. Olcina M. M., Grand R. J., Hammond E. M. ATM activation in hypoxia - causes and consequences // Molecular & Cellular Oncology. 2014. № 1 (1). C. e29903.
128. Ondrej V. et al. Intranuclear trafficking of plasmid DNA is mediated by nuclear polymeric proteins lamins and actin. // Acta Biochimica Polonica. 2008. № 2 (55). C. 307–315.
129. Orr-Weaver T. L., Szostak J. W., Rothstein R. J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1981. № 10 (78). C. 6354–6358.
130. Patt H. M. et al. Cysteine Protection against X Irradiation // Science. 1949. № 2852 (110). C. 213–214.
131. Patt H. M. et al. Radiation dose reduction by cysteine // Journal of Cellular and Comparative Physiology. 1953. № 3 (42). C. 327–341.
132. Petrova D. D. et al. The New General Biological Property of Stem-like Tumor Cells (Part II: Surface Molecules, Which Belongs to Distinctive Groups with Particular Functions, Form a Unique Pattern Characteristic of a Certain Type of Tumor Stem-like Cells) // International Journal of Molecular Sciences. 2022. № 24 (23). C. 15800.
133. Peveri P. et al. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. // Journal of Experimental Medicine. 1988. № 5 (167). C. 1547–1559.
134. Pinho S., Frenette P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2019. № 5 (20). C. 303–320.

135. Potter E. A. et al. A strategy to eradicate well-developed Krebs-2 ascites in mice // *Oncotarget*. 2016. № 10 (7). C. 11580.
136. Potter E. A. et al. Gene expression profiling of tumor-initiating stem cells from mouse Krebs-2 carcinoma using a novel marker of poorly differentiated cells // *Oncotarget*. 2017. № 6 (8). C. 9425–9441.
137. Povirk L. F. et al. Processing of 3'-Phosphoglycolate-terminated DNA Double Strand Breaks by Artemis Nuclease * // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. № 6 (282). C. 3547–3558.
138. Prehn J. H. M., Jirström E. Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020. № 4 (41). C. 442–446.
139. Qi Z. et al. DNA sequence alignment by microhomology sampling during homologous recombination // *Cell*. 2015. № 5 (160). C. 856–869.
140. Riehl T. et al. Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism // *Gastroenterology*. 2000. № 6 (118). C. 1106–1116.
141. Ritter G. S. et al. The new general biological property of stem-like tumor cells Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells // *Frontiers in Genetics*. 2022. (13).
142. Ritter G. S. et al. Impact of Double-Stranded RNA Internalization on Hematopoietic Progenitors and Krebs-2 Cells and Mechanism // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. № 5 (24). C. 4858.
143. Roberts D. D., Kaur S., Isenberg J. S. Regulation of Cellular Redox Signaling by Matricellular Proteins in Vascular Biology, Immunology, and Cancer // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017. № 12 (27). C. 874–911.
144. Rodrigue A. et al. Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break in vivo // *The EMBO Journal*. 2006. № 1 (25). C. 222–231.
145. Rogachev V. A. et al. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell // *Cancer Cell International*. 2006. № 1 (6). C. 23.
146. Rothkamm K. et al. Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle // *Molecular and Cellular Biology*. 2003. № 16 (23). C. 5706–5715.
147. Rubnitz J., Subramani S. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells // *Molecular and Cellular Biology*. 1984. № 11 (4). C. 2253–2258.
148. Rydberg B., Johanson K. J. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells // *DNA repair mechanisms*. – Academic Press, 1978. – C. 465–468.
149. Savill J. et al. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis // *Immunology Today*. 1993. № 3 (14). C. 131–136.
150. Schubert R. et al. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. № 3 (94). C. 961–966.
151. Schwartz D. C., Cantor C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis // *Cell*. 1984. № 1 (37). C. 67–75.
152. Sharma R., Kale R. K. Effect of radiation on glyoxalase I and glyoxalase II activities in spleen and liver of mice // *International journal of radiation biology*. 1993. № 2 (63). C. 233–238.
153. Shi T. et al. Toll-like receptor 5 agonist CBLB502 induces radioprotective effects in vitro // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2017. № 6 (49). C. 487–495.
154. Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2017. (803). C. 51–55.
155. Singh V. K., Romaine P. L. P., Seed T. M. Medical Countermeasures for Radiation Exposure and Related Injuries: Characterization of Medicines, FDA-Approval Status and Inclusion into the Strategic National Stockpile // *Health Physics*. 2015. № 6 (108). C. 607–630.
156. Sørensen C. S. et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A // *Cancer Cell*. 2003. № 3 (3). C. 247–258.
157. Spirin A. S. [Spectrophotometric determination of total nucleic acids] // *Biokhimiia (Moscow, Russia)*. 1958. № 5 (23). C. 656–662.

158. Storici F. et al. RNA-templated DNA repair // *Nature*. 2007. № 7142 (447). C. 338–341.
159. Strieter R. M. et al. Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derived neutrophil chemotactic factor // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1988. № 3 (156). C. 1340–1345.
160. Symington L. S. Focus on recombinational DNA repair // *EMBO reports*. 2005. № 6 (6). C. 512–517.
161. Szostak J. W. et al. The double-strand-break repair model for recombination // *Cell*. 1983. № 1 (33). C. 25–35.
162. Taegtmeier A. B. et al. Neutrophil dysplasia (acquired pseudo-pelger anomaly) caused by ganciclovir // *Transplantation*. 2005. № 1 (80). C. 127–130.
163. Talhaoui I. et al. Poly (ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro // *Nucleic acids research*. – 2016. – Т. 44. – №. 19. – С. 9279-9295.
164. Thoma G.E., Wald N. The diagnosis and management of accidental radiation injury. *Journal 83 ВОПРОСЫ РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ* № 3, 2007 of occupational medicine 1: 421–447; 1959
165. Thomas K. R., Deng C., Capecchi M. R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors // *Molecular and Cellular Biology*. 1992. № 7 (12). C. 2919–2923.
166. Vogin G., Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation // *International Journal of Radiation Biology*. 2013. № 1 (89). C. 2–8.
167. Walden T. L. Jr., Farzaneh N. K. Radioprotection by 16, 16 Dimethyl Prostaglandin E2 is Equally Effective in Male and Female Mice // *Journal of Radiation Research*. 1995. № 1 (36). C. 1–7.
168. Walden Thomas L. Jr., Patchen M., Snyder S. L. 16,16-Dimethyl Prostaglandin E2 Increases Survival in Mice Following Irradiation // *Radiation Research*. 1987. № 3 (109). C. 440–448.
169. Wang X. et al. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival // *Biochemical Journal*. 1998. № 2 (333). C. 291–300.
170. Wanninger J. et al. Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-κB, and STAT3 signaling pathways // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009. № 3 (297). C. G611–G618.
171. Ward J. F. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability под ред. W. E. Cohn, K. Moldave, Academic Press, 1988. C. 95–125.
172. Wardman P. et al. Radiosensitization by Nitric Oxide at Low Radiation Doses // *Radiation Research*. 2007. № 4 (167). C. 475–484.
173. Wielckens K. et al. Stimulation of poly (ADP-ribosyl) ation during Ehrlich ascites tumor cell "starvation" and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide // *Journal of Biological Chemistry*. – 1983. – Т. 258. – №. 7. – С. 4098-4104.
174. Yushok W. D., Mallalieu L. J., Batt W. G. Properties of Krebs 2 ascites carcinoma cells: Weight, size, specific gravity, and protein content // *Journal of the Franklin Institute*. – 1956. – Т. 262. – №. 6. – С. 507-509.
175. Zamecnik P. et al. Electron micrographic studies of transport of oligodeoxynucleotides across eukaryotic cell membranes. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994. № 8 (91). C. 3156–3160.
176. Zanta M. A., Belguise-Valladier P., Behr J. P. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999. №. 1 (96). C. 91–96.