

## Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами

Г.С. Риттер<sup>1</sup>, В.П. Николин<sup>1</sup>, Н.А. Попова<sup>1,2</sup>, А.С. Проскурина<sup>1</sup>, П.Э. Кисаретова<sup>1</sup>, О.С. Таранов<sup>3</sup>, Т.Д. Дубатолова<sup>4</sup>, Е.В. Долгова<sup>1</sup>, Е.А. Поттер<sup>1</sup>, С.С. Кирикович<sup>1</sup>, Я.Р. Ефремов<sup>1,2</sup>, С.И. Байбородин<sup>1,2</sup>, М.В. Романенко<sup>2</sup>, М.И. Мещанинова<sup>5</sup>, А.Г. Веньямина<sup>5</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1</sup>, С.С. Богачев<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>4</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: labmolbiol@mail.ru

**Аннотация.** В работе охарактеризованы некоторые биологические особенности радиопротекторного действия препарата двуцепочечной РНК. Обнаружено, что препарат дрожжевой РНК обладает пролонгированным радиопротекторным действием при облучении животных летальной дозой в 9.4 Гр. При облучении через 1 ч и на 4-е сутки после введения 7 мг препарата РНК выживает 100 % животных на 70-е сутки наблюдения, при облучении на 8-е и 12-е сутки – 60 % животных. Были оценены временные параметры процесса репарации двуцепочечных разрывов, индуцированных  $\gamma$ -лучами. Выявлено, что введение препарата РНК в момент максимального количества двуцепочечных разрывов, через 1 ч после облучения, снижает эффективность радиопротекторного действия по сравнению с введением за 1 ч до облучения и через 4 ч после облучения. Проведено сравнение эффективности радиозащитного действия штатного радиопротектора Б-190 и препарата РНК в одном эксперименте. Установлено, что препарат суммарной РНК не уступает по эффективности препарату Б-190. Выживаемость на 40-е сутки после облучения для группы мышей, получавших препарат РНК, составила 78 %, для Б-190 – 67 % животных. В ходе аналитических исследований препарата суммарной РНК дрожжей обнаружилось, что препарат представляет собой смесь одноцепочечной и двуцепочечной РНК. Радиопротекторными свойствами обладает только двуцепочечная РНК. При введении 160 мкг препарата двуцепочечной РНК выживает 100 % подопытных животных после абсолютно летальной дозы гамма-радиации 9.4 Гр. Установлено, что радиозащитный эффект двуцепочечной РНК зависит не от последовательности, а от ее двуцепочечной формы, причем для осуществления радиопротекторного действия двуцепочечная РНК должна иметь «открытые» концы молекулы. Предполагается, что радиозащитное действие препарата двуцепочечной РНК связано с участием молекул РНК в корректном восстановлении поврежденного облучением хроматина в стволовых клетках крови. Сохранившие жизнеспособность стволовые гемопоэтические клетки мигрируют на периферию и достигают селезенки, где активно пролиферируют. Вновь образовавшаяся клеточная популяция восстанавливает кроветворную и иммунную системы, что определяет выживание летально облученных животных. Ключевые слова: двуцепочечная РНК; Б-190; селезеночные колонии; двуцепочечные разрывы.

**Для цитирования:** Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Кисаретова П.Э., Таранов О.С., Дубатолова Т.Д., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Романенко М.В., Мещанинова М.И., Веньямина А.Г., Колчанов Н.А., Богачев С.С. Характеристика активной субстанции препарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, обладающей радиопротекторными свойствами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6): 643-652. DOI 10.18699/VJ20.658

## Characteristic of the active substance of the *Saccharomyces cerevisiae* preparation having radioprotective properties

G.S. Ritter<sup>1</sup>, V.P. Nikolin<sup>1</sup>, N.A. Popova<sup>1,2</sup>, A.S. Proskurina<sup>1</sup>, P.E. Kisaretova<sup>1</sup>, O.S. Taranov<sup>3</sup>, T.D. Dubatolova<sup>4</sup>, E.V. Dolgova<sup>1</sup>, E.A. Potter<sup>1</sup>, S.S. Kirikovich<sup>1</sup>, Y.R. Efremov<sup>1,2</sup>, S.I. Bayborodin<sup>1,2</sup>, M.V. Romanenko<sup>2</sup>, M.I. Meschaninova<sup>5</sup>, A.G. Venyaminova<sup>5</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1</sup>, S.S. Bogachev<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

<sup>4</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>5</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: labmolbiol@mail.ru

**Abstract.** The paper describes some biological features of the radioprotective effect of double-stranded RNA preparation. It was found that yeast RNA preparation has a prolonged radioprotective effect after irradiation by a lethal dose of 9.4 Gy. 100 % of animals survive on the 70th day of observation when irradiated 1 hour or 4 days after 7 mg RNA preparation injection.

© Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Проскурина А.С., Кисаретова П.Э., Таранов О.С., Дубатолова Т.Д., Долгова Е.В., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Ефремов Я.Р., Байбородин С.И., Романенко М.В., Мещанинова М.И., Веньямина А.Г., Колчанов Н.А., Богачев С.С., 2020

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License

tion, 60 % animals survive when irradiated on day 8 or 12. Time parameters of repair of double-stranded breaks induced by gamma rays were estimated. It was found that the injection of the RNA preparation at the time of maximum number of double-stranded breaks, 1 hour after irradiation, reduces the efficacy of radioprotective action compared with the injection 1 hour before irradiation and 4 hours after irradiation. A comparison of the radioprotective effect of the standard radioprotector B-190 and the RNA preparation was made in one experiment. It has been established that the total RNA preparation is more efficacious than B-190. Survival on the 40th day after irradiation was 78 % for the group of mice treated with the RNA preparation and 67 % for those treated with B-190. In the course of analytical studies of the total yeast RNA preparation, it was found that the preparation is a mixture of single-stranded and double-stranded RNA. It was shown that only double-stranded RNA has radioprotective properties. Injection of 160 µg double-stranded RNA protects 100 % of the experimental animals from an absolutely lethal dose of gamma radiation, 9.4 Gy. It was established that the radioprotective effect of double-stranded RNA does not depend on sequence, but depends on its double-stranded form and the presence of "open" ends of the molecule. It is supposed that the radioprotective effect of double-stranded RNA is associated with the participation of RNA molecules in the correct repair of radiation-damaged chromatin in blood stem cells. The hematopoietic pluripotent cells that have survived migrate to the periphery, reach the spleen and actively proliferate. The newly formed cell population restores the hematopoietic and immune systems, which determines the survival of lethally irradiated animals.

Key words: double-stranded RNA; B-190; spleen colonies; double-stranded breaks.

**For citation:** Ritter G.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Kisaretova P.E., Taranov O.S., Dubatolova T.D., Dolgova E.V., Potter E.A., Kirikovich S.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Romanenko M.V., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Characteristic of the active substance of the *Saccharomyces cerevisiae* preparation having radioprotective properties. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):643-652. DOI 10.18699/VJ20.658 (in Russian)

## Введение

Ионизирующее излучение воздействует на живой организм таким образом, что приводит к повреждению его функциональных систем и гибели. В настоящее время считается, что ионизирующее излучение оказывает наибольшее воздействие на мембранные структуры и ядро клетки. Лизис мембран приводит к разрушению структуры клетки, а дефекты в ядерной ДНК ведут к нарушению интегральной функциональной целостности хроматина, атипическому течению клеточного деления, появлению хромосомных aberrаций и апоптозу (Dent et al., 2003). Основными клетками-мишенями для гамма-лучей являются низкодифференцированные клетки костного мозга, зародышевые клетки семенников, кишечный и кожный эпителии (Bergonié, Tribondeau, 2003; Vogin, Foray, 2013). Радиочувствительность всего организма у млекопитающих приравнивается к радиочувствительности кроветворных клеток, так как их аплазия, возникающая после общего облучения минимальной абсолютно смертельной дозой, приводит к гибели организма.

Под радиозащитным или радиопротекторным эффектом понимают снижение частоты и тяжести постлучевых повреждений биомолекул и (или) стимуляцию процессов их пострadiационной репарации. Наиболее эффективные радиопротекторы относятся к двум классам химических соединений (Patt et al., 1949; Fridovich, 1995). Это серосодержащие радиозащитные вещества (аминотиолы), выполняющие функцию «молекулярных ловушек» свободных радикалов, и производные индолилалкиламинов: агонисты биологически активных аминов, способные через специфические клеточные рецепторы вызывать острую гипоксию и угнетение метаболизма в радиочувствительных тканях (Ward, 1988; Dent et al., 2003; Wang et al., 2013).

Как было сказано ранее, наиболее губительное воздействие ионизирующее излучение оказывает на молекулу ДНК ядерного хроматина. Повреждения хромосом, следующий за этим aberrантный митоз и гибель клетки – это еще один механизм циторедукующего действия иони-

зирующего излучения. При воздействии активных метаболитов на ДНК хроматина возникают все возможные из описанных в литературе повреждения этих молекул. Наиболее фатальными считаются двуцепочечные разрывы (ДЦР). Если в клетке нарушены системы репарации таких повреждений, то клетка запускает механизмы самоуничтожения.

В настоящем исследовании описывается новый принцип радиопротекторного действия, не связанный с протекцией от непосредственно  $\gamma$ -кванта и с ограничением воздействия оксидативного стресса, вызываемого вторичными радикалами, а характеризующийся успешным пострadiационным восстановлением стволовых гемопоэтических предшественников, обусловленным участием в репаративном процессе фрагментов экстраклеточной двуцепочечной нуклеиновой кислоты. Такое введение в репаративный процесс внешнего «корректора» в конечном итоге определяет восстановление кроветворной и иммунной системы и сохранение жизнеспособности облученного организма.

## Материалы и методы

**Животные.** В работе были использованы трехмесячные мыши линий СВА/Лас, С57ВL и СС57ВR (самцы и самки, 18–22 г) разведения вивария Института цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН. Животные содержались в группах по 6–10 мышей на клетку со свободным доступом к пище и воде.

**Облучение экспериментальных животных** проводили на  $\gamma$ -установке (источник  $Cs^{137}$  ИГО 1, Россия) дозой 9.4 Гр при мощности дозы 0.74–1.4 Гр/мин. Подопытных и контрольных мышей облучали группами по 9–10 животных в контейнере размером 20 × 20 × 40 см. Радиопротекторное действие препарата суммарной РНК дрожжей (НПО «Биолар», Россия) оценивали по гибели экспериментальных животных в промежутках времени до 30–90 сут. Препарат суммарной РНК дрожжей и двуцепочечная РНК вводились мышам однократно внутривенно

до облучения в количестве, отдельно указанном для каждого эксперимента. Оценка количества селезеночных колоний после фиксации органа в 4 % параформальдегиде проводилась на 9–12-е сутки после облучения.

**Выделение фракций препарата РНК.** Хроматография препарата РНК выполняли на колонке объемом 10 мл, диаметром 1 см. Сухой гидроксипатит (ГАП) подвергали набуханию в 10 мл воды, после чего заполняли колонку. Колонку промывали 30 мл 0.01 М PBS. Наносили на колонку раствор РНК и промывали 30 мл 0.01 М PBS. Элюировали РНК 0.15 М PBS, затем промывали 0.18 М PBS и повторно элюировали нуклеиновые кислоты 0.25 М PBS. Полученный при хроматографии раствор РНК в PBS диализовали против ТЕ-буфера ( $H_2O$ , обработанная DEPC; 10 mM Tris-HCl, 10 mM ЭДТА, pH 7.4) при +4 °C в течение суток с двумя сменами буфера. Электрофорез препаратов нуклеиновых кислот проводился в 1 % или 1.5 % агарозном геле с содержанием 2 мкг/мл бромистого этидия в трис-ацетатном буфере.

**Выделение клеток костного мозга.** Клетки костного мозга мышей вымывали из трубчатых костей средой RPMI-1640, тщательно ресуспендировали. Суспензию аккуратно наслаивали на 3 мл смеси фикола-урографина (15 % урографин, 7 % фикола,  $\rho = 1.119$ ), центрифугировали при 400 g, 4 °C в течение 40 мин. После центрифугирования вся клеточная масса разделялась на клетки, составляющие интерфазное кольцо (моноклеары) и осадок. Моноклеары отбирали в новую пробирку, промывали 4 мл RPMI-1640 и осаждали центрифугированием при 400 g, 4 °C в течение 5 мин.

**Анализ репаративного цикла в клетках костного мозга.** Через 30, 60 и 120 мин после облучения мышей линии СВА абсолютно летальной дозой 9.4 Гр из трубчатых костей выделяли клетки костного мозга. Анализ репаративного цикла по количеству ДЦР осуществляли методом «кометных хвостов» или при помощи антител к гистону  $\gamma$ -H2aX, как описано в работе (Dolgova et al., 2014). Длину «кометных хвостов» (TM – tail moment) оценивали в программе CASP и ImageJ. Образцы, окрашенные антителами к гистону  $\gamma$ -H2aX, анализировали при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSAria в ЦКП проточной цитофлуориметрии ИЦиГ СО РАН. Значения, полученные после анализа 50–100 кометных хвостов, были нормированы к показателям, определенным в 30-й минуте, и усреднены.

**Патоморфологический анализ органов.** Органы фиксировались в 4 % формальдегиде и заливались в парафиновые блоки. Парафиновые срезы проводились через серию спиртов и окрашивались гематоксилином-эозином.

**Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата суммарной РНК дрожжей и штатного радиопротектора Б-190.** В качестве препарата сравнения использовали радиопротектор Б-190 (ФГУП НПЦ «Фармазащита» ФМБА России). Препарат Б-190 вводили мышам за 20 мин до облучения перорально в количестве 2.5 мг/мышь в объеме 0.25 мл. Препарат суммарной РНК вводили мышам за 60 мин до облучения внутривенно в количестве 7 мг/мышь в объеме 0.5 мл (0.15 М PBS). Сравняли выживаемость животных после облучения дозой 9.4 Гр, делали патоморфологический анализ органов.

**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 (Dische, 1957). 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 ( $p_{20} = 1.836$ ). К осадку нуклеиновых кислот добавляют 0.5 мл раствора едкого натра (0.1 М) и приливают равный объем дифениламинового реактива. Раствор нагревают в течение 15–20 мин на кипящей водяной бане. Появляется характерное для субстрата окрашивание.

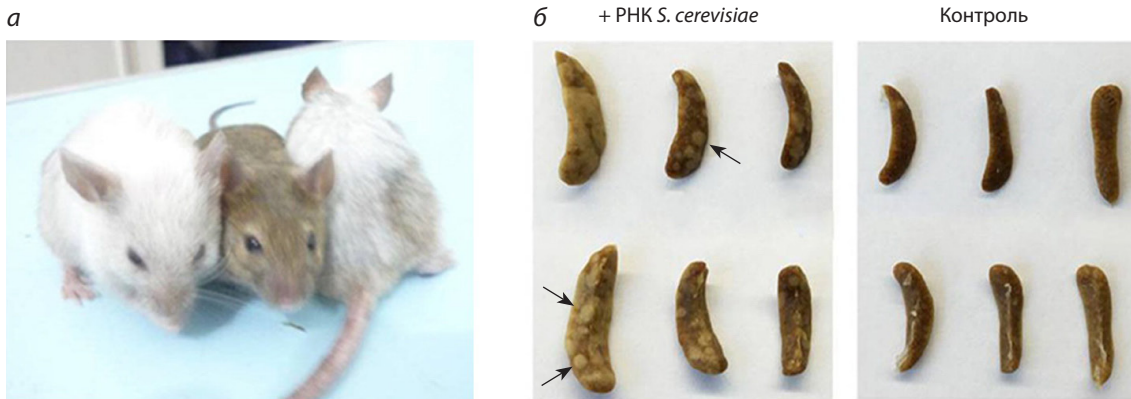
**Клонирование кДНК копий молекул РНК, элюирующихся с ГАП 0.25 М PBS.** Для получения кДНК с РНК использовали систему ревертазного синтеза и набор DOP-PCR master kit («Медиген»). кДНК копии клонировали в плазмидном векторе Bluescript (НПО «Вектор») после «полировки» концов фрагментов с помощью Pfu полимеразы и трансформировали в электрокомпетентные клетки XL1-Blue MRF. Штамм *E. coli* XL1-Blue MRF любезно предоставлен лабораторией иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН. После анализа электрофоретической подвижности ДНК, выделенной из полученных трансформантов, отобранные клоны были секвенированы с использованием протокола фирмы Applied Biosystems (США) при помощи автоматического ДНК секвенатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer с 8-канальным капиллярным блоком. Секвенированные клоны анализировались в программе Vector NTI. Последовательности были выравнены и собраны в группы гомологии. Контекстный анализ проводили на сайте <http://genome.ucsc.edu>, используя инструмент Vlat.

## Результаты

### Радиопротекторное действие суммарной дрожжевой РНК

Было проанализировано 10 различных серийных препаратов дрожжевой суммарной РНК на ее способность защищать животных от летальной дозы  $\gamma$ -радиации. Обнаружено, что радиозащитный эффект препарата прямо не связан с процентным содержанием РНК и белка в препарате. Оценена длительность радиозащитного действия препарата. Для этого очищенная стерильная РНК дрожжей в количестве 7 мг вводилась экспериментальным мышам линии С57BL за час, за сутки, за 4, 8 и 12 сут до облучения летальной дозой радиации 9.4 Гр. Оказалось, при облучении через 1 ч и на 4-е сутки от введения препарата РНК выживает 100 % животных на 70-е сутки наблюдения, при облучении на 8-е и 12-е сутки – 60 % животных (Риттер и др., 2018).

Состояние экспериментальных животных, выживших после летальных доз  $\gamma$ -радиации в отдаленные сроки после проведенного облучения, свидетельствовало о значительных нарушениях в клетках, формирующих кожный покров мышей. В течение 50–150 дней после обработки мыши прогрессивно седали (рис. 1, а). Анализ развития селезеночных колоний после облучения, проведенного на



**Рис. 1.** Радиопротекторное действие препарата РНК при облучении мышей абсолютно летальной дозой радиации 9.4 Гр. *a* – фенотипическое сравнение мышей СВА, облученных через час после введения препарата РНК (по бокам), и интактной мыши (в центре) через 150 дней после облучения; *б* – селезеночные колонии, сформированные у животных, обработанных препаратом РНК, и у контрольных животных, выявляемые на 9–12-й день после проведенного облучения. Стрелками указаны лейкоцитарные колонии, являющиеся критерием выживаемости экспериментальных мышей.

9–12-е сутки после воздействия, предполагал, что главной мишенью воздействия препарата РНК являлись стволовые клетки крови костного мозга (см. рис. 1, б). Спасенные от разрушения ионизирующим облучением гемопоэтические предшественники способны выходить на периферию и заполнять 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.

#### Радиотерапевтическое действие препарата суммарной РНК дрожжей, ориентированное на временные параметры цикла репарации ДЦР в клетках костного мозга мышей, индуцированных гамма радиацией

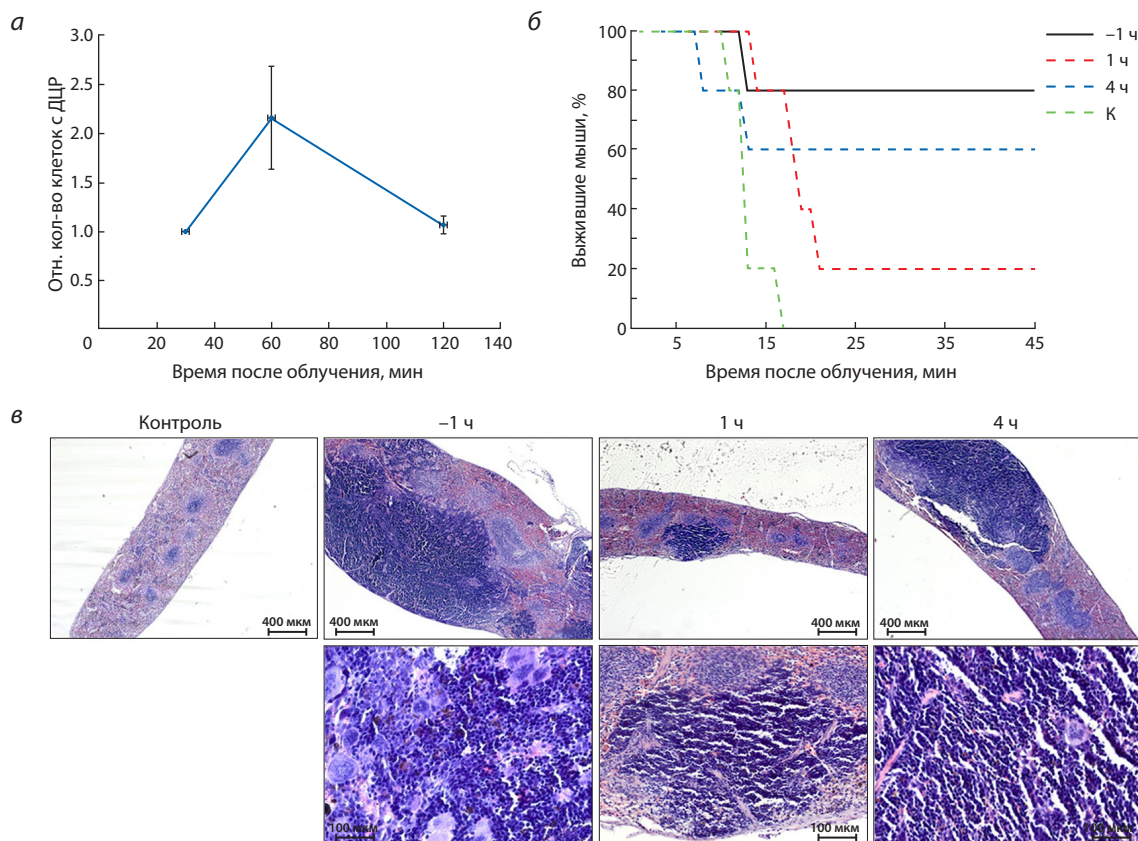
Известно, что  $\gamma$ -радиация индуцирует разрушение хроматина в клетках костного мозга и в том числе в стволовых клетках крови, что и приводит к развитию лучевой болезни и гибели организма (Goodhead, 1994; Belli et al., 2002; Morgan, 2003a, b; Shemetun, Pilinska, 2019). Основным повреждением хромосом являются ДЦР, некорректное восстановление которых приводит к aberrантному митозу и апоптозу. В этой связи в начальных экспериментах были оценены временные параметры процесса репарации ДЦР, индуцированных  $\gamma$ -лучами. Мыши подвергались воздействию летальной дозы облучения 9.4 Гр, клетки костного мозга вымывались через 30, 60 и 120 мин после облучения. Количество ДЦР оценивали «методом комет» или по свечению специфических антител к гистону  $\gamma$ H2AX (Rogakou et al., 1998, 1999; Maréchal, Zou, 2013). Результаты измерений суммированы в графике на рис. 2, а.

Установлено, что основной пик накопления ДЦР приходится на 60 мин от получения дозы радиации 9.4 Гр. К 120 мин и в более поздние сроки наблюдается практически полное восстановление целостности хроматина, тем не менее кривая не опускается до значений, полученных до облучения (данные не приводятся). Этот факт позволяет предполагать, что в указанный отрезок времени

детектируются ДЦР, являющиеся интермедиатами репарации, идущей по механизму гомологичной рекомбинации в клетках, находившихся на момент облучения в фазе S клеточного цикла. По результатам проведенных исследований для оценки радиотерапевтического действия препарата РНК были выбраны временные точки 1 и 4 ч. Идея выбора состояла в том, чтобы воздействовать на клетки репаративного процесса по механизму негомологичного объединения концов в клетках, находившихся в момент облучения в фазе G1, и во время, когда возможно продолжение репарации по механизму гомологичной рекомбинации в клетках, находившихся в момент облучения в фазе S клеточного цикла (см. рис. 2, б). Установлено, что препарат РНК обладает определенным радиотерапевтическим эффектом при его введении в определенный момент времени после завершения репаративного процесса по механизму негомологичного объединения концов. Введение препарата РНК во время идущей репарации негомологичного объединения концов приводит к гибели мышей экспериментальной группы в стандартные временные параметры, показанные для контроля (11–14-е сутки после обработки радиацией).

Параллельно был проведен патоморфологический анализ селезенок контрольных и экспериментальных мышей (см. рис. 2, в). Как показали более ранние эксперименты, основное действие препарат РНК оказывает на стволовые клетки крови, которые, пережив радиацию, мигрируют в селезенку, где формируют селезеночные колонии. Предполагалось, что в селезенках мышей, входящих в группы с высокой долей выживаемости, будут обнаружены центры размножения лимфоцитов, потомков выживших и мигрировавших в селезенку стволовых клеток крови.

Патоморфологический анализ свидетельствует о следующем. В селезенках мышей контрольной группы лимфатические фолликулы достаточно многочисленны, однако резко сокращены в размерах до периферической зоны фолликулярной (центральной) артерии. У мышей, которым ввели препарат РНК за час до облучения (группа «–1 ч»), большая часть паренхимы занята сплошной



**Рис. 2.** Определение радиопротекторного действия препарата РНК относительно времени репарации ДЦР.

*а* – продолжительность цикла репарации ДЦР в клетках костного мозга мышей после воздействия летальной дозы  $\gamma$ -радиации 9.4 Гр. На графике приведено относительное количество клеток костного мозга мышей, в которых детектируются ДЦР; *б* – график выживаемости экспериментальных животных, обработанных препаратом РНК в критических точках репаративного процесса, установленных в результате анализа репаративного цикла ДЦР. Мышам вводили 7 мг препарата РНК за 1 ч до облучения (-1 ч), через 1 ч после облучения (1 ч) либо через 4 ч после облучения (4 ч); К – контрольная группа, мышей препаратом РНК не обрабатывали; *в* – гистологические препараты (окраска гематоксилином-эозином) селезенок мышей на 11-е сутки после облучения. Контроль – селезенка большей частью опустошена, лимфатические фолликулы достаточно многочисленные, однако резко сокращены в размерах и ограничены периферической зоной центральной артерии; -1 ч – большая часть паренхимы органа занята крупным скоплением пролиферирующих лимфоцитов; 1 ч – на фоне общего резкого уменьшения количества клеток красной и белой пульпы обнаруживается один крупный очаг лимфоцитарной пролиферации; 4 ч – по меньшей мере половину площади среза занимают крупные очаги пролиферации лимфоидных элементов.

массой пролиферирующих лимфоцитов. У группы «1 ч», которой препарат РНК ввели через час после облучения, обнаруживается один крупный очаг пролиферации лимфоцитов, занимающий менее 1/10 объема паренхимы. У группы «4 ч», получившей препарат РНК через 4 ч после облучения, по меньшей мере половину объема стромы занимают крупные очаги пролиферации лимфоидных элементов.

Полученный результат говорит об активной пролиферации клеточных элементов в паренхиме селезенок мышей, обработанных до облучения и через 4 ч после экспозиции к  $\gamma$ -лучам.

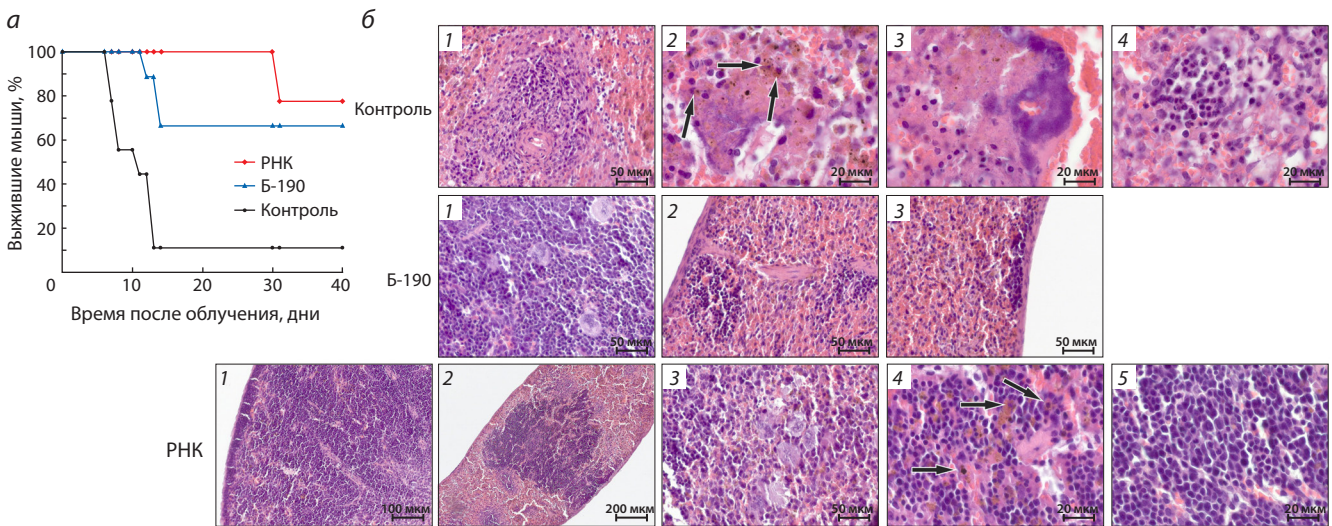
### Сравнение эффективности радиопротекторного действия препарата суммарной РНК дрожжей и штатного радиопротектора Б-190

При сравнении эффективности радиозащитного действия радиопротектора Б-190 и препарата РНК в одном эксперименте (рис. 3, *а*) установлено, что препарат суммарной РНК обладает ярко выраженным радиопротекторным дей-

ствием, не уступающим по эффективности штатному препарату Б-190. Выживаемость на 40-е сутки после облучения для группы мышей, получавших препарат РНК, составила 78 %, для Б-190 – 67 % животных.

Был проведен патоморфологический анализ селезенок и трех отделов кишечника мышей, взятых из групп суммарной РНК и Б-190 (см. рис. 3, *б*). Ткани и органы забирались на 11-е сутки после проведенного облучения в абсолютно летальной дозе 9.4 Гр. Значимых патоморфологических изменений в эпителии кишечника экспериментальных мышей не обнаружено.

В селезенке мышей контрольной группы наблюдались только отдельные бластные клетки, лежащие небольшими островками среди сохранившихся клеток стромы. У животных обеих опытных групп, суммарной РНК и Б-190, в селезенке отмечено большое количество эритроидных клеток как в просвете сосудов, так и в паренхиме, при этом значительную их часть составляли молодые клетки кроветворной ткани, располагавшиеся в виде различного размера колоний. Таким образом, в опытных группах в



**Рис. 3.** Сравнение радиопротекторного действия препарата Б-190 и препарата суммарной РНК.

**а** – выживаемость животных после облучения дозой 9.4 Гр.

**б** – световая микроскопия. **Контроль:** 1 – лимфатический фолликул редуцирован до размера периартериальной зоны, 2 – множество сидерофагов (показаны стрелками) на фоне лизированных эритроцитов, 3 – скопление бактериальных клеток, 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 (стрелки), 5 – молодые клетки лимфопоэза.

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, отмечены 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 ТЭМ исследовании. Кроме того, среди мезенхимальных клеток 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.

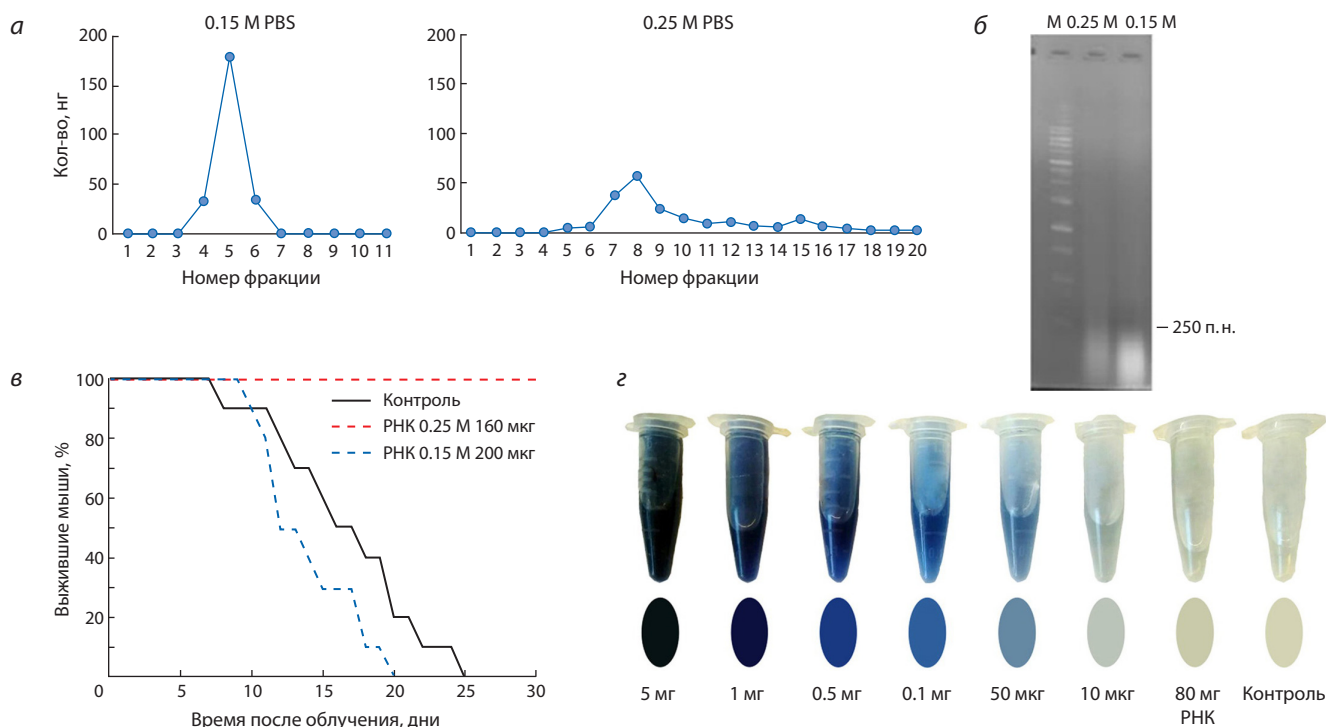
### Радиопротекторное действие двух фракций дрожжевой РНК

Аналитическое исследование препарата суммарной РНК дрожжей свидетельствовало, что в препарате присутствуют две четко разграниченные фракции, одна из которых элюируется с ГАП как одноцепочечная РНК при элюции

0.15 М PBS. Вторая фракция элюируется в условиях, характерных для двуцепочечных нуклеиновых кислот, при 0.25 М PBS. Размер элюирующихся нуклеиновых кислот находился в пределах 50–400 п. н. (рис. 4, а, б). Проведенные эксперименты по радиопротекции обеих фракций свидетельствовали, что при равных количествах радиопротекторные свойства характерны только для фракции, элюирующейся в 0.25 М PBS. При этом количество вводимого препарата, необходимое для радиопротекторного действия, многократно сокращалось. Если для достижения 80–100 % радиозащитного эффекта требуется 7–10 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  $\gamma$ -облучения (см. рис. 4, в).

Одним из интригующих вопросов, касающихся фракции дрожжевой РНК, обладающей радиопротекторным действием и 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 нами проведены эксперименты по характеристике молекулярного состава данной фракции суммарной РНК дрожжей. Для исследования, как и для экспериментов по радиопротекции, фракционирование нуклеиновых кислот препарата дрожжевой РНК осуществляли методом адсорбционной хроматографии на колонке с ГАП. Определено, что в препарате суммарной РНК присутствует ~1–3 % нуклеиновых кислот в двуцепочечной форме.

Для определения типа нуклеиновых кислот фракций были выполнены различные эксперименты с использованием обработки нуклеазами (ДНКаза I, SI нуклеаза) после



**Рис. 4.** Идентификация фракции препарата суммарной РНК дрожжей, определяющей его радиопротекторное действие.

**а** – хроматография суммарной РНК дрожжей на ГАП. На графиках представлены профили элюции нуклеиновых кислот в 0.15 и 0.25 М PBS; **б** – электрофоретический анализ подвижности фракций нуклеиновых кислот 0.15 и 0.25 М в 1 % агарозном геле, окраска бромистым этидием, М – маркер молекулярного веса 1 kb; **в** – радиопротекторное действие фракции препарата суммарной РНК, полученной элюцией с ГАП 0.25 М PBS. Препараты РНК вводили мышам СВА за 40 мин до облучения; **г** – оценка содержания ДНК в препарате суммарной РНК дрожжей по цветной реакции Дише. Представлены результаты цветной реакции различных количеств (10–5000 мкг) препарата ДНК в сравнении с препаратом нуклеиновых кислот, полученным после гидролиза 80 мг суммарной дрожжевой РНК. В верхней части рисунка показаны цветные изображения образцов после реакции Дише, в нижней – цветовые гаммы полученных образцов в сравнении с цветами шкалы Pantone. В качестве контроля использовали реакционный буфер.

денатурации или щелочью, или кипячением, или без таковой, которые не дали однозначно трактуемых результатов. В результате, чтобы установить принадлежность анализируемой фракции к тому или иному типу нуклеиновых кислот, был выбран метод анализа нуклеиновых кислот с использованием дифениламина и специфической цветной реакции на дезоксирибозу. Предполагалось, что если в исходной РНК присутствует ~1–3 % двуцепочечной формы нуклеиновых кислот, то при выделении из большого количества исходного препарата РНК (50–100 мг) будет получена уверенная, однозначно трактуемая цветная реакция. Исходный препарат РНК в количестве 80 мг гидролизали 24 ч слабой щелочью. После гидролиза проводилось осаждение полимерной формы нуклеиновых кислот. Полученные результаты свидетельствуют, что фракция препарата суммарной РНК, элюирующаяся в 0.25 М фосфатном буфере, является двуцепочечной формой РНК (см. рис. 4, г), и, таким образом, можно полагать, что радиопротекторный эффект обусловлен молекулами двуцепочечной РНК.

#### Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов двуцепочечной РНК фракции 0.25 М

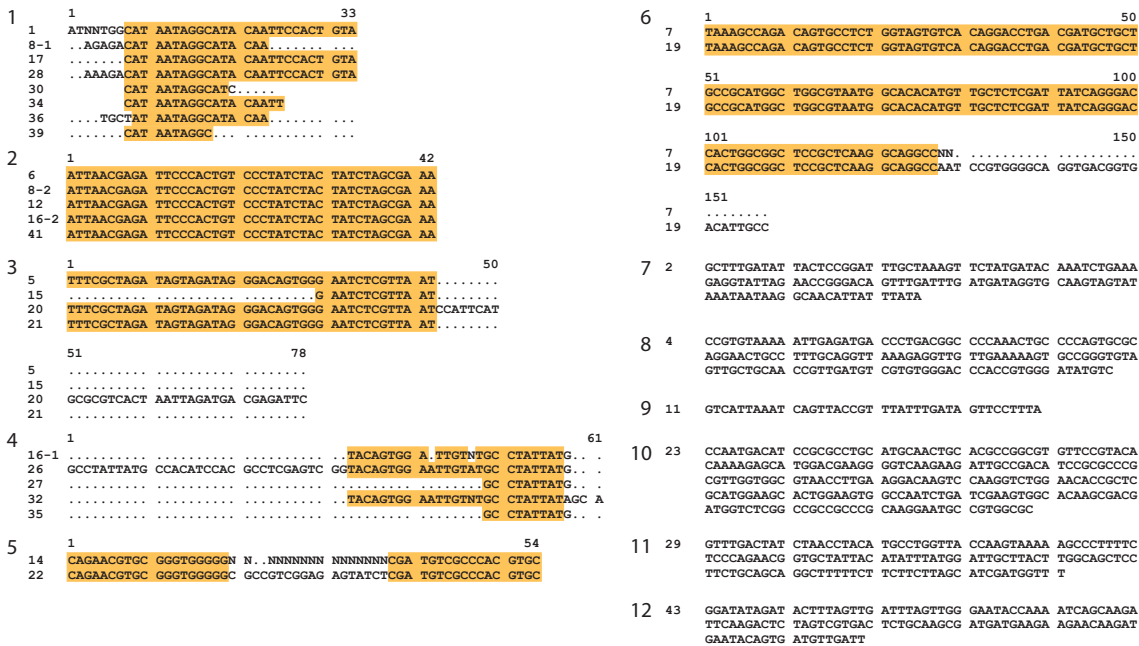
Для понимания происхождения РНК фракции 0.25 М было необходимо определить принадлежность составляющих двуцепочечных РНК фрагментов к генетическому локусу хромосом дрожжей. Фрагменты двуцепочечной

РНК фракции, элюирующейся 0.25 М PBS, клонировали и секвенировали. Последовательности были объединены в группы гомологий (рис. 5). Анализ последовательностей секвенированных клонов свидетельствует, что в популяции выделяемых молекул присутствуют различные типы РНК, относящиеся к РНК рибосомального кластера или к транскриптам, кодирующим белки, ассоциированные с рибосомами. Приведенные данные предполагают, что для радиозащитного действия нуклеотидные последовательности фрагментов РНК не имеют значения.

С помощью программы <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> была проанализирована возможность секвенированных РНК образовывать шпилечные структуры. Для этого были выбраны наиболее протяженные последовательности из каждой группы гомологий. В результате обнаружено, что все проанализированные последовательности могут формировать шпилечные структуры. Для многих вариантов энергия образования шпилек (энергия Гиббса) имеет высокое значение, что предполагает преимущественное формирование таких структур (данные не приводятся).

#### Обсуждение

В нашей ранней работе (Likhacheva et al., 2007) было показано, что фрагментированная ДНК (препарат «Панаген», ЛСР № 004429/08 от 09.06.2008, ДНК мыши), введенная в организм смертельно облученных мышей, обладает вы-



**Рис. 5.** Определение структуры двуцепочечной РНК. Группы гомологий и видовая принадлежность секвенированных последовательностей: 1, 4–8, 10, 12 – видовая принадлежность не определена; 2, 3 – фрагмент гена 25S рибосомальной РНК *S. cerevisiae*; 9 – фрагмент гена 18S рибосомальной РНК *S. cerevisiae*; 11 – фрагмент гена TMA22 (YJR014W) *S. cerevisiae*, кодирующего белок, ассоциированный с рибосомой.

раженным радиопротекторным действием – при ЛД100/30 выживаемость животных составляет 70–90 %. При этом радиопротекторный эффект фрагментов двуцепочечной ДНК коррелирует с развитием селезеночных колоний. Кроме того, при внутривенном введении экстраклеточная двуцепочечная ДНК доставляется в клетки костного мозга, в том числе в CD34+ стволовые гемопоэтические клетки мыши, где может депонироваться и обнаруживается в течение 14 дней после введения (Dolgoва et al., 2013a, b). Именно эти два факта легли в основу предположения, что фрагменты двуцепочечной ДНК спасают стволовые гемопоэтические клетки, которые мигрируют на периферию, стабилизируются в селезенке и дают начало новой кроветворной и иммунной системам мышинного организма, разрушенной высокодозовой  $\gamma$ -радиацией.

Поскольку было показано, что двуцепочечная форма нуклеиновых кислот (ДНК) отвечает за радиопротекторный эффект, детектируемый в проведенных экспериментах, нами сделано предположение, что за радиопротекторный эффект препарата суммарной РНК *S. cerevisiae* отвечает присутствующая в нем двуцепочечная фракция нуклеиновых кислот.

Хроматографией на гидроксипатите была выделена фракция препарата РНК, элюирующаяся с колонки как двуцепочечная форма нуклеиновых кислот. Биологические тесты на радиопротекторные свойства этой фракции однозначно свидетельствовали, что за радиопротекторный эффект препаратов РНК дрожжей отвечает двуцепочечная форма нуклеиновых кислот, составляющая ~1–3 % от суммарной РНК препарата, находящегося в работе. При этом эффективная доза ЛД100/30 для суммарного препарата составляла 7–10 мг/мышь, в то время как для двуцепочечной формы – 160 мкг/мышь, что в ~60 раз меньше. В много-

кратных экспериментах показано, что введение препарата двуцепочечной нуклеиновой кислоты за 60–30 мин до облучения полностью купирует радиационное действие  $\gamma$ -потока. Выживает 80–100 % экспериментальных мышей.

С использованием метода дифференцированного гидролиза щелочью и кислотой и специфического качественного окрашивания на присутствие ДНК было установлено, что двуцепочечная форма, выделяемая в составе препаратов РНК и обладающая радиопротекторными свойствами, представляет собой двуцепочечную РНК. Фрагменты двуцепочечной РНК, переведенные в форму кДНК, были клонированы и секвенированы. Определено, что смесь фрагментов двуцепочечной РНК гетерогенна по первичной структуре и, по-видимому, для осуществления радиопротекторного действия не требуется специфической последовательности.

При анализе радиозащитного действия двуцепочечной РНК установлено, что так же, как и в случае с препаратами двуцепочечной ДНК, в селезенках экспериментальных животных формируются селезеночные колонии. Колонии состоят из пролиферирующих клеточных элементов, которые, как предполагается, представляют собой потомков, спасенных стволовых гемопоэтических предшественников, дающих начало новой кроветворной и иммунной системе, которые были разрушены облучением.

Введение препарата в точку максимально активной репарации ДЦР, идущей по механизму негомологического объединения концов, через 1 ч после получения полной летальной дозы 9.4 Гр (см. рис. 2, б) не защищает мышей от гибели от облучения. При этом инъекции препарата через 4 ч после облучения, т. е. тогда, когда активная фаза процесса репарации негомологического объединения концов завершена, эффективно (до 60 %) спасают мышей от



гибели. У таких животных полностью восстанавливаются кроветворные ростки костного мозга и детектируется вырванное колониобразование в селезенках.

Предполагается, что фрагменты двуцепочечной РНК, доставленные в клетку в момент идущего репаративного процесса, интерферируют процесс репарации негомологичного объединения концов, причем эта интерференция может быть обусловлена различными механизмами (конкуренция связывания репаративных комплексов, индукция конфликтного репаративного процесса иной природы, блокада квазиматрицей субстратных двуцепочечных концов).

Облучение с указанной дозой 9.4 Гр и мощностью 0.74–1.4 Гр/мин является острым облучением, для которого появление и накопление ДЦР, оцененное методом фокусов к гистону  $\gamma$ H2X, происходит к 40–60-й минуте после окончания облучения (Peitzsch et al., 2013; Озеров, Осипов, 2015). Такой результат близок к данным, полученным в настоящем исследовании.

Известно, что при остром облучении помимо простых ДЦР формируются «сложные», образующиеся в результате индукции других повреждений хроматина и активации иных репаративных процессов (Озеров, Осипов, 2015). Авторы цитируемой работы сообщают, что до 20 % ДЦР при  $\gamma$ -облучении относятся к «сложным повреждениям» и репарируются значительно позже, чем ДЦР, индуцированные непосредственным разрывом хроматина. Возможно, обнаруженный терапевтический эффект связан с репарацией хроматина в стволовых клетках костного мозга по типу гомологичной рекомбинации с участием внешней РНК матрицы. Этот тип репарации активируется значительно позже по сравнению с аварийным негомологичным объединением концов. Тот факт, что на графиках, полученных при оценке числа ДЦР, показатели в последней анализируемой точке (2 ч) ни в одном из приведенных экспериментов не опускались до значения исходной нулевой отметки, согласуется с высказанным выше предположением.

В литературе известны варианты репаративных процессов с использованием РНК и ДНК матрицы. Для РНК 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 et al., 2016). Для двуцепочечной ДНК также известны различные модели репарации с привлечением внешней двуцепочечной матрицы (Leung et al., 1997; Bärtsch et al., 2000; Li et al., 2001; Symington, 2005). Характерным для участия таких нуклеиновых кислот в идущем репаративном процессе является внедрение процессированного 3'ОН конца разорванного хроматина между цепей внешней матрицы и формирование интермедиата репарации. Далее могут осуществляться различные описанные варианты достраивания цепей и восстановления целостности хроматина. Можно предположить, что репарация в присутствии экстраклеточных двуцепочечных РНК идет именно по такому общему молекулярному сценарию. О важной роли двуцепочечной формы нуклеиновых кислот при осуществлении 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 два-три порядка.

Полное отсутствие радиозащитного действия у препарата одноцепочечной РНК в дозах, сопоставимых с радиопротекторными дозами двуцепочечной РНК, предполагает, что радиопротекторное действие двуцепочечной РНК связано с появившейся в клеточном прострэнстве стволовых гемопоэтических клеток внехромосомной двуцепочечной матрицы. Внедрение между цепями такой двуцепочечной РНК матрицы процессированного филамента ДНК ДЦР может быть главным событием, определяющим дальнейшие фазы репарации фатального повреждения, индуцированного  $\gamma$ -радиацией.

## Заклучение

Таким образом, данные молекулярно-биологических исследований, экспериментов с использованием клеточных технологий и биологические тесты свидетельствуют, что субстанцией, определяющей радиопротекторное действие фракции «0.25 М» РНК дрожжей *S. cerevisiae*, является двуцепочечная форма молекул РНК.

## Список литературы / References

- Озеров И.В., Осипов А.Н. Кинетическая модель репарации двуни-  
тевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при  
действии редкоионизирующего излучения с различной мощ-  
ностью дозы. *Компьютерные исследования и моделирование*.  
2015;7(1):159-176. DOI 10.20537/2076-7633-2015-7-1-159-176.  
[Ozerov I.V., Osipov A.N. Kinetic model of DNA double-strand  
break repair in primary human fibroblasts exposed to low-LET irra-  
diation with various dose rates. *Kompyuternye Issledovaniya i Mo-  
delirovanie = Computer Research and Modeling*. 2015;7(1):159-  
176. DOI 10.20537/2076-7633-2015-7-1-159-176. (in Russian)]
- Риттер Г.С., Николин В.П., Попова Н.А., Кисаретова П.Э., Долго-  
ва Е.В., Проскурина А.С., Поттер Е.А., Кирикович С.С., Бай-  
бородин С.И., Таранов О.С., Ефремов Я.Р., Колчанов Н.А.,  
Богачев С.С. Изучение радиопротекторного действия двуцепо-  
чечной РНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.  
В: Четвертый междисциплинарный науч. форум с междунар. участием  
«Новые материалы и перспективные технологии»: Сб. материа-  
лов. М., 2018;II:161-167.  
[Ritter G.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Kisaretova P.E., Dol-  
gova E.V., Proskurina A.S., Potter E.A., Kirikovich S.S., Bay-  
borodin S.I., Taranov O.S., Efremov Y.R., Kolchanov N.A., Bo-  
gachev S.S. Study of radioprotective action of double-stranded RNA  
extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. In: The Fourth interdis-  
ciplinary scientific forum with international participation "New Mate-  
rials and Promising Technologies": Proceedings. Moscow, 2018;II:  
161-167. (in Russian)]
- Bärtsch S., Kang L.E., Symington L.S. *RAD51* is required for the repair  
of plasmid double-stranded DNA gaps from either plasmid or chro-  
mosomal templates. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(4):1194-1205. DOI  
10.1128/mcb.20.4.1194-1205.2000.
- Belli M., Sapora O., Tabocchini M.A. Molecular targets in cellular re-  
sponse to ionizing radiation and implications in space radiation pro-  
tection. *J. Radiat. Res.* 2002;43(S):S13-S19. DOI 10.1269/jrr.43.s13.
- Bergonié J., Tribondeau L. Interpretation of some results from radio-  
therapy and an attempt to determine a rational treatment technique  
(1906). *Yale J. Biol. Med.* 2003;76(4):181-182.
- Dent P., Yacoub A., Contessa J., Caron R., Amorino G., Valerie K.,  
Hagan M.P., Grant S., Schmidt-Ullrich R. Stress and radiation-induced  
activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat. Res.*  
2003;159(3):283-300. DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0283:  
sariao]2.0.co;2.

- Dische Z. In: Colowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.). *Methods in Enzymology*. Vol. III. New York: Acad. Press, 1957.
- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. DOI 10.4161/cbt.29854.
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. 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*. 2013a;528(2):74-83. DOI 10.1016/j.gene.2013.06.058.
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Baiborodin S.I., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Bogachev S.S., Gvozdeva T.S., Malkova E.M., Taranov O.S., Rogachev V.A., Panov A.S., Zagrebnyi S.N., Shurdov M.A. Pathological changes in mice treated with cyclophosphamide and exogenous DNA. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 2013b;3(4):291-304. DOI 10.1134/S2079059713040035.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 1995;64(1):97-112. DOI 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- Goodhead D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 1994;65(1):7-17. DOI 10.1080/09553009414550021.
- Leung W., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94(13):6851-6856. DOI 10.1073/pnas.94.13.6851.
- 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. *Mol. Cell Biol.* 2001;21(2):501-510. DOI 10.1128/mcb.21.2.501-510.2001.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Rogachev V.A., Prokhorovich M.A., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose  $\gamma$ -radiation. *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007;11(2):305-314.
- Maréchal A., Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(9). DOI 10.1101/cshperspect.a012716.
- Meers C., Keskin H., Storic F. DNA repair by RNA: templated, or not templated, that is the question. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:17-21. DOI 10.1016/j.dnarep.2016.05.002.
- Morgan W.F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. *Radiat. Res.* 2003a;159(5):567-580. DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0567:nadeoe]2.0.co;2.
- Morgan W.F. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vivo*, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.* 2003b;159(5):581-596. DOI 10.1667/0033-7587(2003)159[0581:nadeoe]2.0.co;2.
- Patt H.M., Tyree E.B., Straube R.L., Smith D.E. Cysteine protection against X irradiation. *Science*. 1949;110(2852):213-214. DOI 10.1126/science.110.2852.213.
- Peitzsch C., Kurth I., Kunz-Schughart L., Baumann M., Dubrovskaya A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother. Oncol.* 2013;108(3):378-387. DOI 10.1016/j.radonc.2013.06.003.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J. Cell Biol.* 1999;146(5):905-915. DOI 10.1083/jcb.146.5.905.
- Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 1998;273(10):5858-5868. DOI 10.1074/jbc.273.10.5858.
- Shemetun O.V., Pilinska M.A. Radiation-induced bystander effect – modeling, manifestation, mechanisms, persistence, cancer risks. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2019;24:65-92. DOI 10.33145/2304-8336-2019-24-65-92.
- Storic F., Bebenek K., Kunkel T.A., Gordenin D.A., Resnick M.A. RNA-templated DNA repair. *Nature*. 2007;447(7142):338-341. DOI 10.1038/nature05720.
- Symington L.S. Focus on recombinational DNA repair. *EMBO Rep.* 2005;6(6):512-517. DOI 10.1038/sj.embor.7400438.
- Vogin G., Foray N. The law of Bergonié and Tribondeau: a nice formula for a first approximation. *Int. J. Radiat. Biol.* 2013;89(1):2-8. DOI 10.3109/09553002.2012.717732.
- Wang Y., Xu C., Du L.Q., Cao J., Liu J.X., Su X., Zhao H., Fan F.Y., Wang B., Katsube T., Fan S.J., Liu Q. Evaluation of the comet assay for assessing the dose-response relationship of DNA damage induced by ionizing radiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(11):22449-22461. DOI 10.3390/ijms141122449.
- Ward J.F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1988;35(C):95-125. DOI 10.1016/S0079-6603(08)60611-X.

#### ORCID ID

G.S. Ritter orcid.org/0000-0003-1573-3795  
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331  
O.S. Taranov orcid.org/0000-0002-6746-8092  
T.D. Dubatolova orcid.org/0000-0003-2807-774X  
E.V. Dolgova orcid.org/0000-0002-5543-248X  
E.A. Potter orcid.org/0000-0003-1558-8655

S.S. Kirikovitch orcid.org/0000-0002-3426-4501  
Ya.R. Efremov orcid.org/0000-0002-0649-7543  
M.V. Romanenko orcid.org/0000-0003-2184-8919  
M.I. Meschaninova orcid.org/0000-0003-0045-2413  
A.G. Venyaminova orcid.org/0000-0002-7858-6932  
N.A. Kolchanov orcid.org/0000-0001-6800-8787  
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382

**Благодарности.** Работа поддержана бюджетным финансированием Института цитологии и генетики СО РАН по теме государственного задания № 0324-2019-0042-С-01 (номер госрегистрации АААА-А17-117071240065-4) и грантом РФФИ № 18-34-00205. Работы по микроскопии клеток выполнены при поддержке бюджетного финансирования Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН по теме государственного задания № 0310-2019-0005.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.02.2020. После доработки 16.07.2020. Принята к публикации 16.07.2020.