НАУКА ЮГА РОССИИ 2017 Т. 13 № 4 С. 101–106
SCIENCE IN THE SOUTH OF RUSSIA 2017 VOL. 13 No 4 P.101–106

БИОЛОГИЯ

УДК 57.085.23
DOI: 10.23885/2500-0640-2017-3-4-101-106

ПОЛУЧЕНИЕ РАДИОРЕЗИСТЕНТНЫХ ВАРИАНТОВ КЛЕТОК ЛИНИЙ HeLa И DU145

© 2017 г. Д.А. Чеботарев[1], М.А. Махоткин[1], А.В. Набока[1], М.Г. Тютякина[1], В.А. Тарасов[1]

Аннотация. Наряду с гормональной, радиационная терапия является основным методом лечения на поздних стадиях развития рака. Однако ее эффективность ограничивается возникновением радиорезистентных клонов клеток. В связи с этим исследование механизмов, обусловливающих радиорезистентность клеток опухоли, имеет не только фундаментальное, но и практическое значение.

Основной метод при проведении генетических исследований – получение мутантов по интересующим нас признакам. В случае клеток млекопитающих, культивируемых *in vitro*, таким методом является не выделение клонов мутантных клеток, а получение резистентных вариантов с измененными характеристиками анализируемого признака. Это в полной мере относится к чувствительности клеток к действию ионизирующего излучения.

Методом многократного дробного облучения гамма-квантами нами получены радиорезистентные варианты клеточных линий аденокарциномы шейки матки HeLa и карциномы предстательной железы DU145. Уровень репродуктивной гибели клеточных линий измеряли при помощи клоногенного теста. Цитологическую оценку интерфазной гибели клеток, включающей в себя апоптоз и некроз, проводили на препаратах, окрашенных Hoechst 33342. Уровень репродуктивной гибели в полученных радиорезистентных вариантах по сравнению с их нативными вариантами статистически значимо уменьшался при всех дозах облучения, в то время как интерфазная гибель продемонстрировала значимое уменьшение лишь при высоких дозах радиации.

Ключевые слова: радиорезистентность, апоптоз, репродуктивная гибель клеток, рак, клеточные линии, DU145, HeLa.

OBTAINING OF RADIORESISTANT VARIANTS OF HeLa AND DU145 CELL LINES

D.A. Chebotarev[1], M.A. Makhotkin[1], A.V. Naboka[1], M.G. Tyutyakina[1], V.A. Tarasov[1]

Abstract. Along with hormonal, radiation therapy is the main method of treatment in advanced stages of cancer. However, its effectiveness is limited by the occurrence of radioresistant cell clones. In this connection, the study of the mechanisms that determine the radio-resistance of tumor cells is not only fundamental, but also practical.

The main method for performing genetic studies is to obtain mutants after the features of interest. In case of mammalian cells cultured in vitro, such method is the preparation of resistant variants with altered characteristics of the feature being analyzed, rather than isolating mutant cell clones. This fully applies to the sensitivity of cells to the action of ionizing radiation.

Radioresistant variants of the cell lines of cervical adenocarcinoma HeLa and prostate carcinoma DU145 were obtained by repeated fractional gamma irradiation. The level of reproductive death of cell lines was assessed with the use of a clonogenic test. The cytological evaluation of interphase cell death, which includes

[1] Институт аридных зон Южного научного центра Российской академии наук (Institute of Arid Zones, Southern Scientific Centre, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation), Российская Федерация, 344006, г. Ростов-на-Дону, пр. Чехова, 41, e-mail: last-che@yandex.ru

apoptosis and necrosis, was performed on preparations stained with Hoechst 33342. It was shown that the level of reproductive death in the obtained radioresistant variants in comparison with their native variants significantly decreased at all doses of irradiation, while interphase death showed a significant decrease only at high radiation doses.

Keywords: radioresistance, apoptosis, reproductive cell death, cancer, cell lines, DU145, HeLa.

ВВЕДЕНИЕ

Природа и механизмы, лежащие в основе чувствительности живых объектов к действию ионизирующего излучения, были и остаются ключевой проблемой радиационной биологии и генетики. Уже на первом этапе радиобиологических исследований было обнаружено, что незначительные в энергетическом отношении дозы облучения вызывают значительный биологический эффект. Так, например, поглощенная доза ионизирующего излучения, эквивалентная тепловой энергии в стакане подогретой воды, является летальной для человека. Еще одной особенностью радиации, отличающей ее от других экзогенных факторов, является беспороговость воздействия. Для объяснения этих особенностей биологического действия в 1922 г. Дессауэром была сформулирована гипотеза точечного тепла, развитие которой привело к созданию принципа попаданий [1]. В основе этого принципа лежали представления о том, что эффект радиации определяется стохастическим процессом попаданий квантов ионизирующего излучения во внутриклеточные мишени, поражение которых определяет реакцию клеток на радиационное воздействие. Эти представления легли в основу теории мишени, развитой в работах Краузера, Циммера, Тимофеева-Ресовского и Дельбрюка и являвшейся господствующей вплоть до конца 50-х гг. прошлого столетия [1; 2].

После открытия молекулы ДНК как основного носителя наследственной информации и процесса ее репарации [3; 4] стало ясно, что при действии ионизирующего излучения возникают первичные повреждения ДНК. Их судьба определяется в пострадиационный период времени: либо на их основе сформируются необратимые летальные и мутационные дефекты, либо восстановится нативная структура поврежденного участка. Было показано, что от величины дозы радиации зависит не только число возникающих первичных повреждений, но и вероятность их перехода в необратимую форму [5; 6]. Оказалось, что как про-, так и эукариоты обладают генетически детерминированной системой, контролирующей клеточный ответ на индукцию повреждений ДНК. Впервые существование такой системы показано на примере так называемого SOS-ответа у *Escherichia coli* [7].

В настоящее время известно, что в клетках человека ответ на индукцию повреждения ДНК включает в себя процессы, связанные со стабильностью клеточного генома, такие как апоптоз, задержку клеточного цикла и репарацию. В контроль этих процессов включены многие десятки, если не сотни генов [8]. При этом изменение их экспрессии, как правило, приводит к увеличению чувствительности, но не резистентности клеток к действию ионизирующего излучения. Вместе с тем рецидивы после радиационной терапии злокачественных опухолей связаны с возникновением *de novo* либо отбором уже существующих клеточных клонов опухоли, резистентных к воздействию радиации. Однако механизм этой радиорезистентности остается до конца не выясненным.

Исследования последних 10–15 лет показали, что в клеточном ответе на стрессовые воздействия существенную, если не ключевую роль играют эпигенетические модификации генома, и в первую очередь изменения экспрессии микроРНК [9]. Несмотря на то, что в настоящее время установлена ключевая роль этих модификаций в дифференцировке клеток и злокачественном перерождении, механизм их возникновения остается неясным. Данная работа посвящена получению радиорезистентных вариантов клеток HeLa и DU145 с целью дальнейшей идентификации микроРНК, участвующих в контроле радиорезистентности исследуемых линий клеток с использованием метода массового параллельного секвенирования и трансфекции генов-предшественников микроРНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культура клеток. В работе использовали клеточные линии HeLa и DU145, предоставленные лабораторией цитоскелета Научно-исследовательского института физико-химической биологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Клетки культивировали в среде Игла МЕМ (ООО «БиолоТ», Россия), содер-

жащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина, при температуре 37 °С в 5%-й атмосфере CO_2.

Получение радиорезистентных субклонов клеток DU145 и HeLa. За 24 часа до облучения клетки засевали в культуральные флаконы 75 см^2 в количестве 6 × 10^5 для формирования монослоя с конфлюэнтностью 50 %. Обработку γ-квантами проводили дистанционно при помощи гамма-терапевтическиого аппарата Theratron Equinox 100 (MDS Nordion, Канада), использующего в качестве радионуклидного источника ^{60}Co с интенсивностью 1,0–1,3 Гр/мин. Облучение проводили в дозе 4 Гр один раз в неделю. Сразу после воздействия радиации осуществляли смену культуральной среды и помещали флаконы в инкубатор. Через 24 часа после облучения производили пересев в соотношении 1/3–1/4 и поддерживали культуру субконфлюэнтной до следующего облучения. Накопленная доза для обоих субклонов составила 44 Гр. Клетки родительской линии культивировали, подсчитывали и транспортировали в тех же условиях, но без радиационной обработки. Были получены радиорезистентные субклоны DU145-RR и HeLa-RR. Наличие радиорезистентности определяли при помощи клоногенного теста и изменений в уровне клеточной гибели. Перед тестированием все линии культивировали в течение 2 недель без воздействия радиации.

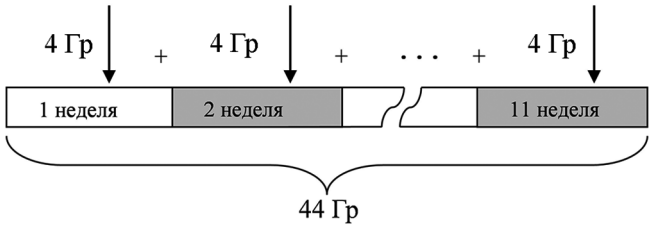

Рис. 1. Схема получения радиорезистентных вариантов исходных линий.
Fig. 1. The scheme for obtaining of radioresistant variants of base lines.

Клоногенный тест. Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, засевали в 6-луночные планшеты. Плотность засева определяли по результатам предварительных опытов по облучению клеток и ожидаемому количеству колоний, приблизительно равному 50. Облучение проводили через 6 часов после засева в дозе 0, 2, 4 и 6 Гр на планшет. Для формирования колоний планшеты инкубировали 10 дней при температуре 37 °С в 5%-й атмос-

Таблица 1. Относительное изменение клоногенности клеток нативных и радиорезистентных вариантов линий HeLa и DU145
Table 1. Relative change of clonogenicity of cells in native and radioresistant variants of HeLa and DU145 cell lines

Доза радиации Radiation dose	Контрольная линия Control line		Резистентная линия Resistant line		Относительное изменение клоногенности, $\log_2 F_d$ / The relative change in clonogenicity, $\log_2 F_d$	Значимость различий The significance of differences	
	Посеяно клеток / Planted cells	Сформировано колоний / Formed colonies	Посеяно клеток Planted cells	Сформировано колоний / Formed colonies		Значение χ^2 The value of χ^2	p
HeLa							
0 Гр (Gy)	150	103	180	105	−0,24	3,3	>0,05
2 Гр (Gy)	180	66	210	101	0,39	5,7	<0,02
4 Гр (Gy)	350	44	375	97	0,88	14,6	<0,01
6 Гр (Gy)	750	24	750	53	0,88	7,3	<0,01
DU145							
0 Гр (Gy)	300	84	450	136	0,11	0,54	>0,05
2 Гр (Gy)	450	76	600	136	0,42	5,7	<0,02
4 Гр (Gy)	900	83	1200	146	0,40	4,9	<0,05
6 Гр (Gy)	1800	67	3000	202	0,86	19,9	<0,01

Примечание. Критические уровни χ^2: 3,84 для p = 0,05; 5,41 для p = 0,02; 6,64 для p = 0,01.
Note. Critical levels of χ^2: 3.84 for p = 0.05; 5.41 for p = 0.02; 6.64 for p = 0.01.

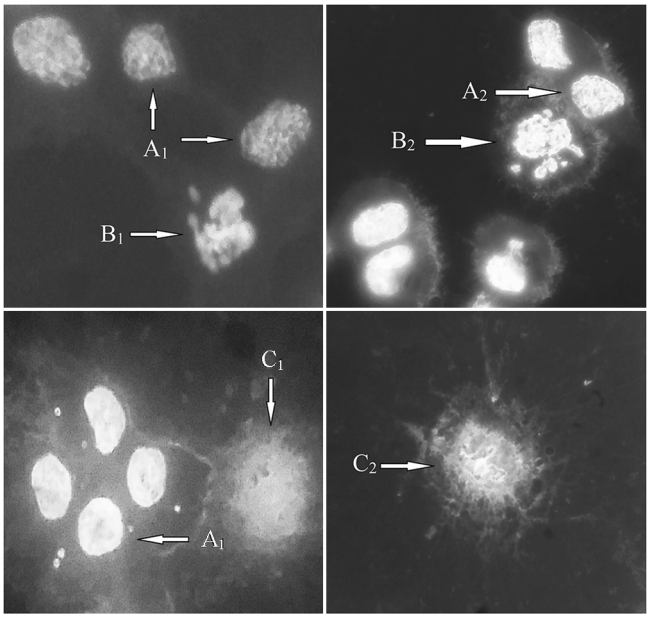

Рис. 2. Изображения клеток использованных линий, окрашенных Hoechst 33342.
В живых клетках DU145 (A_1) и HeLa (A_2) ядра выглядели округлыми и равномерно окрашенными. В апоптотических клетках DU145 (B_1) и HeLa (B_2) ядро фрагментируется и окрашивается более интенсивно из-за конденсации ДНК. В некротических клетках DU145 (C_1) и HeLa (C_2) ДНК не конденсируется, а края ядра менее четко определены.
Fig. 2. Images of used cell lines stained with Hoechst 33342.
In living cells DU145 (A_1) and HeLa (A_2) the nucleus appeared rounded and uniformly colored. In apoptotic cells DU145 (B_1) and HeLa (B_2), the nucleus is fragmented and colored more intensively due to DNA condensation. In necrotic cells DU145 (C_1) and HeLa (C_2), DNA does not condense, and the edges of the nucleus are less clearly defined.

фере CO_2. Через 10 дней колонии фиксировали 70%-м этанолом и окрашивали 1%-м раствором метиленового синего. Учитывали колонии, образованные не менее чем 50 клетками. Относительное увеличение резистентности для каждой дозы облучения рассчитывали по формуле:

$$F_d = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{N_2}{N_1},$$

где F_d – отношение частот образования клонов засеянных клеток радиорезистентных и исходных линий при дозе облучения d; n_1 – число колоний контрольной линии; n_2 – число колоний резистентной линии; N_1 – засеяно клеток контрольной линии; N_2 – засеяно клеток резистентной линии.

Определение уровня клеточной гибели. Суспензию, содержащую 5×10^3 клеток, засевали в 12-луночные планшеты с покровными стеклами, помещенными на дно лунок. Через 24 часа проводили облучение в дозе 0, 2, 4, 6 и 8 Гр на планшет. Окраску препаратов и микроскопическую оценку уровня клеточной гибели проводили через 24 часа в соответствии с протоколом [10].

Статистический анализ. При оценке статистической значимости различий гибели клеток и способности формировать колонии использовали метод χ^2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение радиорезистентных вариантов. Известно, что частота индуцированных мутаций возрастает линейно при увеличении дозы ионизирующей радиации. В результате мутационный эффект радиационного воздействия не зависит от режима подачи дозы облучения, а определяется величиной суммарной поглощенной дозы [2]. В этой связи для получения радиорезистентных вариантов исследуемых линий нами был использован метод дробного многократного облучения (рис. 1).

Оценка репродуктивной гибели клеток. Клоногенный тест. Общая клеточная гибель включает в себя интерфазную и репродуктивную. Репродуктивная гибель происходит через ряд делений и заключается в неспособности клеток формировать колонии. В таблице 1 представлены результаты оценки способности клеток нативных и радиорезистентных вариантов линий HeLa и DU145 образовывать колонии после радиационного воздействия (клоногенный тест). Видно, что клоногенность полученных после многократного дробного облучения DU145-RR и HeLa-RR отличается от исходных линий увеличением, что указывает на повышенную устойчивость к действию ионизирующего излучения.

Оценка интерфазной гибели клеток. Интерфазная гибель клеток включает в себя некроз и апоптоз. Некроз связан с неспецифической реакцией клеток на радиационное воздействие, в то время как апоптоз контролируется генетически. На рисунке 2 показаны примеры апоптотических и некротических вариантов гибели в клетках DU145 и HeLa.

Изменения уровня клеточной гибели показаны на рисунке 3 для линий DU145 и DU145-RR и на рисунке 4 для HeLa и HeLa-RR.

Видно, что уровень интерфазной гибели в полученных радиорезистентных клеточных линиях по сравнению с их нативными вариантами статистически значимо уменьшался лишь при высоких дозах – 6 и 8 Гр для DU145 и 8 Гр для HeLa. При более низких дозах уровень интерфазной гибели либо не отличался, либо даже превосходил таковой в исходных линиях клеток.

Таким образом, относительный вклад интерфазной и репродуктивной гибели клеток, в основе которой лежат хромосомные аберрации, зависит

от величины дозы радиации [11]. Если при малых дозах основную роль в клеточной гибели играет апоптоз, то по мере увеличения дозы радиации вклад репродуктивной гибели возрастает [12]. Это связано с тем, что по мере увеличения дозы частота возникновения хромосомных аберраций монотонно возрастает, а частота апоптоза имеет тенденцию к насыщению.

В результате полученные данные дают основания полагать, что основной вклад в радиорезистентность полученных нами вариантов линий вносит изменение эффективности процессов, связанных с формированием хромосомных аберраций, и, как следствие этого, с репродуктивной клеточной гибелью. Эти процессы включают в себя репарацию и рекомбинацию ДНК, а также структурную реорганизацию хромосом при протекании их репликации и предмитотической упаковки [13]. Нарушение регуляции последнего процесса лежит в основе индуцированной радиацией хромосомной нестабильности, характеризующейся увеличением частоты возникновения хромосомных аберраций в ряду клеточных поколений после облучения [14].

Несмотря на то, что исследования нестабильности генома имеют не только теоретическое, но и практическое значение, поскольку она является ключевым фактором прогрессии злокачественной опухоли [15], ее механизм остается в настоящее время до конца не выясненным [16]. Наряду с генными мутациями и хромосомными аберрациями, радиационное воздействие приводит к сайт-специфическому аберрантному метилированию ДНК и модификации гистонов, а также к аберрантной экспрессии микроРНК [17]. На наш взгляд, эти эпигенетические изменения влияют на экспрессию белок-кодирующих генов, включая гены, участвующие в контроле процессов структурной реорганизации генома, лежащих в основе образования хромосомных аберраций.

Исследования выполнены в соответствии с Государственным заданием по теме № 0259-2014-0007 (№ госрегистрации 01201363192) в рамках проекта «Идентификация и анализ генетических и эпигенетических детерминант, участвующих в контроле развития злокачественных опухолей и ответе клеток на стрессовые воздействия».

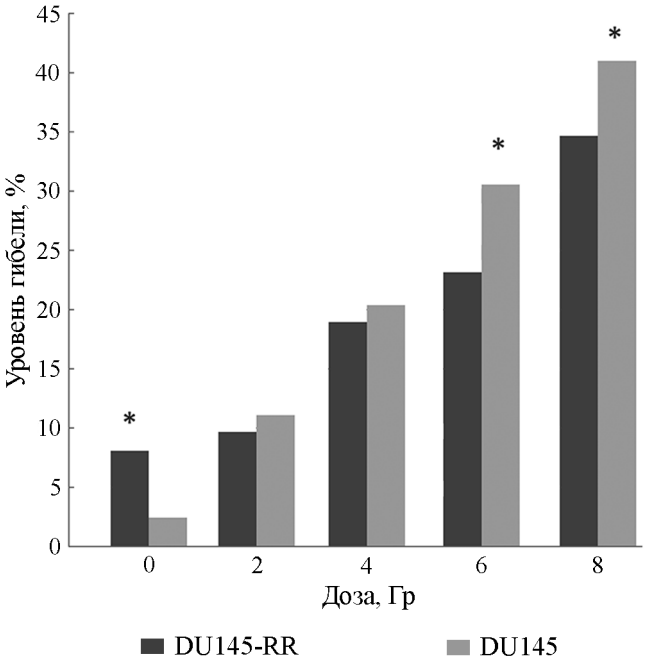

Рис. 3. Уровень интерфазной клеточной гибели DU145 и DU145-RR. * – статистически значимые отличия, $p < 0{,}01$.
Fig. 3. Interphase cell death rate of DU145 and DU145-RR. * – statistically significant differences, $p < 0.01$.

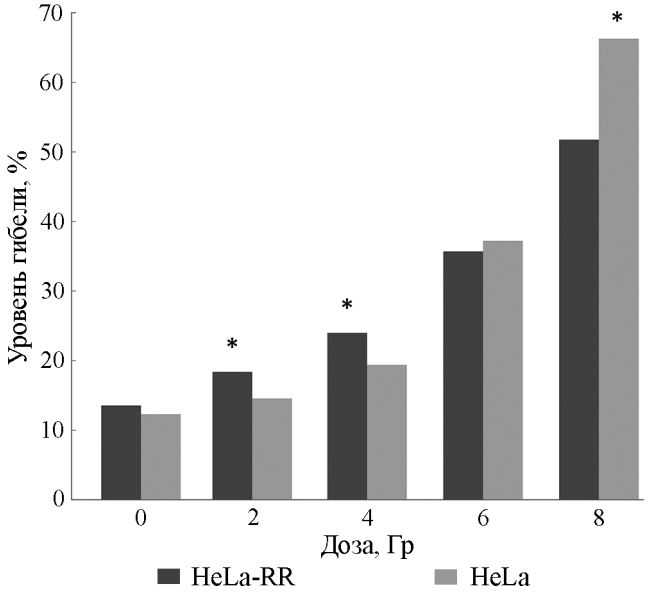

Рис. 4. Уровень интерфазной клеточной гибели HeLa и HeLa-RR. * – статистически значимые отличия, $p < 0{,}01$.
Fig. 4. Interphase cell death rate of HeLa and HeLa-RR. * – statistically significant differences, $p < 0.01$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Циммер К.Г. 1962. *Проблемы количественной радиобиологии.* М., Госатомиздат: 99 с.
2. Тимофеев-Ресовский Н.В. 2009. *Избранные труды*. М., Наука: 511 с.
3. Setlow R.B., Carrier W.L. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 51(2): 226–231.
4. Boyce R.P., Howard-Flanders P. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 51(2): 293–300.

5. Дубинин Н.П., Дубинина Л.Г., Тарасов В.А. 1965. О механизме химической защиты при радиационном поражении хромосом человека в культуре ткани. *Генетика*. 1(5): 68–80.
6. Dubinin N.P., Tarasov V.A. 1968. Problems of radiation mutagenesis. *Atomic energy review.* 6(3): 101–212.
7. Radman M. 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In: *Molecular mechanisms for repair of DNA*. New York, Plenum Press: 355–367.
8. Menendez D., Inga A., Resnick M.A. 2010. Potentiating the p53 network. *Discovery medicine*. 10(50): 94–100.
9. Mendell J.T., Olson E.N. 2012. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 148(6): 1172–1187. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.005
10. Crowley L.C., Marfell B.J., Waterhouse N.J. 2016. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2016(9): 778–781. doi: 10.1101/pdb.prot087205
11. Andreev S.G., Eidelman Y.A. 2011. Dose-response prediction for radiation-induced chromosomal instability. *Radiation Protection Dosimetry.* 143(2–4): 270–273. doi:10.1093/rpd/ncq509
12. Luzhna L., Filkowski J., Kovalchuk O. 2016. High and low dose radiation effects on mammary adenocarcinoma cells – an epigenetic connection. *Oncoscience*. 3(3–4): 88–97. doi: 10.18632/oncoscience.298
13. Kramer D., Stark N., Schulz-Heddergott R., Erytch N., Edmunds S., Roßmann L., Bastians H., Concin N., Moll U.M., Dobbelstein M. 2017. Strong antitumor synergy between DNA crosslinking and HSP90 inhibition causes massive premitotic DNA fragmentation in ovarian cancer cells. *Cell Death and Differentiation.* 24: 300–316. doi: 10.1038/cdd.2016.124
14. Lavelle C., Foray N. 2014. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 49: 84–97. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.012
15. Mavragani I.V., Nikitaki Z., Souli M.P., Aziz A., Nowsheen S., Aziz K., Rogakou E., Georgakilas A.G. 2017. Complex DNA damage: a route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. *Cancers*. 9(7): 91. doi: 10.3390/cancers9070091
16. Han W., Yu K.N. 2009. Response of cells to ionizing radiation. In: *Advances in biomedical sciences and engineering*. Oak Park, Bentham Science Publishers: 204–262.
17. Тарасов В.А., Махоткин М.А., Бойко Н.В., Шин Е.Ф., Тютякина М.Г., Чикунов И.Е., Набока А.В., Машкарина А.Н., Кирпий А.А., Матишов Д.Г. 2017. Роль метилирования ДНК в наследуемости индуцированной радиацией аберрантной экспрессии микроРНК. *Генетика.* 53(5): 551–561. doi: 10.7868/S0016675817050125

REFERENCES

1. Zimmer K.G. 1962. *Problemy kolichestvennoy radiobiologii.* [*Studies on quantitative radiation biology*]. Moscow, Gosatomizdat: 99 p. (In Russian).
2. Timofeev-Resovskiy N.V. 2009. *Izbrannye trudy.* [*Selected works*]. Moscow, Nauka: 511 p. (In Russian).
3. Setlow R.B., Carrier W.L. 1964. The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 51(2): 226–231.
4. Boyce R.P., Howard-Flanders P. 1964. Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 51(2): 293–300.
5. Dubinin N.P., Dubinina L.G., Tarasov V.A. 1965. [On the mechanism of chemical protection from radiation damage of human chromosomes in tissue cultures]. *Genetika*. 1(5): 68–80. (In Russain).
6. Dubinin N.P., Tarasov V.A. 1968. Problems of radiation mutagenesis. *Atomic energy review.* 6(3): 101–212.
7. Radman M. 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In: *Molecular mechanisms for repair of DNA*. New York, Plenum Press: 355–367.
8. Menendez D., Inga A., Resnick M.A. 2010. Potentiating the p53 network. *Discovery medicine*. 10(50): 94–100.
9. Mendell J.T., Olson E.N. 2012. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 148(6): 1172–1187. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.005
10. Crowley L.C., Marfell B.J., Waterhouse N.J. 2016. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2016(9): 778–781. doi: 10.1101/pdb.prot087205
11. Andreev S.G., Eidelman Y.A. 2011. Dose-response prediction for radiation-induced chromosomal instability. *Radiation Protection Dosimetry.* 143(2–4): 270–273. doi:10.1093/rpd/ncq509
12. Luzhna L., Filkowski J., Kovalchuk O. 2016. High and low dose radiation effects on mammary adenocarcinoma cells – an epigenetic connection. *Oncoscience*. 3(3–4): 88–97. doi: 10.18632/oncoscience.298
13. Kramer D., Stark N., Schulz-Heddergott R., Erytch N., Edmunds S., Roßmann L., Bastians H., Concin N., Moll U.M., Dobbelstein M. 2017. Strong antitumor synergy between DNA crosslinking and HSP90 inhibition causes massive premitotic DNA fragmentation in ovarian cancer cells. *Cell Death and Differentiation* 24: 300–316. doi: 10.1038/cdd.2016.124
14. Lavelle C., Foray N. 2014. Chromatin structure and radiation-induced DNA damage: from structural biology to radiobiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 49: 84–97. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.012
15. Mavragani I.V., Nikitaki Z., Souli M.P., Aziz A., Nowsheen S., Aziz K., Rogakou E., Georgakilas A.G. 2017. Complex DNA damage: a route to radiation-induced genomic instability and carcinogenesis. *Cancers*. 9(7): 91. doi: 10.3390/cancers9070091
16. Han W., Yu K. N. 2009. Response of cells to ionizing radiation. In: *Advances in biomedical sciences and engineering*. Oak Park, Bentham Science Publishers: 204–262.
17. Tarasov V.A., Makhotkin M.A., Boyko N.V., Shin E.F., Tyutyakina M.G., Chikunov I.E., Naboka A.V., Mashkarina A.N., Kirpiy A.A., Matishov D.G. 2017. Importance of DNA methylation in the inheritance of radiation-induced aberrant expression of microRNA. *Russian Journal of Genetics*. 53(5): 551–560 doi: 10.1134/S1022795417050118

Поступила 04.08.2017