

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ микроРНК ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. М. А. Янишевская^{1, *}, Е. А. Блинова^{1, 2}, А. В. Аксеев^{1, 2}

¹Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, 454141 Россия

²Челябинский государственный университет, Челябинск, 454001 Россия

*e-mail: yanishevskaya@urcrm.ru

Поступила в редакцию 31.03.2023 г.

После доработки 17.05.2023 г.

Принята к публикации 30.05.2023 г.

Проведена оценка относительной экспрессии зрелых микроРНК в клетках периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в малых дозах в отдаленном периоде. В исследование были включены люди, подвергшиеся облучению в 1950-х гг. на р. Тече (Южный Урал, Россия). Кумулятивные дозы облучения красного костного мозга (ККМ) лиц из основной исследуемой группы (33 человека) находились в диапазоне от 77.7 до 2869.8 мГр (среднее значение – 698.5 мГр). Группу сравнения составили 30 человек, с дозой облучения ККМ, не превышающей 70 мГр за весь период жизни. Обратную транскрипцию образцов РНК проводили с использованием специфических шпилькообразных праймеров (“stem-loop”). Изменение относительного содержания микроРНК оценивали методом ПЦР “в реальном времени” на приборе CFX96 (“BioRad”, США). Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. У облученных людей спустя 60 лет обнаружено статистически значимое зависимое от дозы облучения ККМ увеличение содержания микроРНК hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, hsa-miR-16.

Ключевые слова: микроРНК, экспрессия, ПЦР, Южный Урал, хроническое облучение, радиационное воздействие.

DOI: 10.31857/S0016675823100156, **EDN:** ZWDVWN

Многочисленные исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что существенную роль в регуляции широкого спектра клеточных функций в нормальных клетках, таких как клеточный метаболизм, пролиферация, дифференцировка, передача сигналов и апоптоз играют различные микроРНК [1].

В отличие от других известных эпигенетических механизмов регуляции биологических процессов в клетке, таких как метилирование CpG-островков промоторных районов генов, модификации гистонов, АТФ-зависимое ремоделирование хроматина, микроРНК контролируют экспрессию множества генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, активируя или, зачастую, ингибируя продукцию конкретных белков, принимающих непосредственное участие в защите клетки от неблагоприятных внешнесредовых этиологических факторов [2].

Регулируя большинство клеточных функций, микроРНК вовлечены в патогенез широкого спектра заболеваний. Так, специфические изменения профиля экспрессии различных микроРНК были установлены при многих злокачественных новообразованиях [3–6]. Аберрантная экспрессия

микроРНК наблюдается также при других патологических состояниях, включая заболевания сердечно-сосудистой системы, печени и почек [7–9].

Согласно современным данным литературы, профиль экспрессии микроРНК может быть значительно изменен после радиационного воздействия как в сторону понижения, так и в сторону повышения, в зависимости от типа клеток [10], дозы, времени после облучения [11] и характера радиационного воздействия (острое или хроническое [12]). Снижение экспрессии микроРНК было установлено уже через 30 мин после радиационного воздействия в дозе 1 Гр в нормальных фибробластах человека [13]. Измененный профиль экспрессии микроРНК после облучения также был зарегистрирован в иммортализованных клеточных линиях [14, 15] и клетках периферической крови [16, 17].

Последние исследования демонстрируют более 150 потенциальных микроРНК, чувствительных к действию радиации [18–20]. Имеются данные, которые предполагают использовать микроРНК в качестве критерия для оценки радиационного воздей-

Таблица 1. Характеристика исследуемых лиц

Характеристика групп		Основная группа <i>N</i> = 33	Группа сравнения <i>N</i> = 30
Возраст на момент обследования, лет: <i>M</i> ± <i>SE</i> (min–max)		78.0 ± 1.1 (69.0–93.0)	70.7 ± 1.6 (62.0–88.0)
Пол, <i>N</i> (%)	мужчины	10 (30.3)	13 (43.3)
	женщины	23 (69.7)	17 (56.7)
Этническая принадлежность, <i>N</i> (%)	славяне	16 (48.5)	18 (60.0)
	тюрки	17 (51.5)	12 (40.0)
Поглощенные дозы облучения ККМ, мГр <i>M</i> ± <i>SE</i> (min–max)		698.5 ± 103.3 (77.7–2869.8)	19.5 ± 3.1 (2.1–56.1)

Примечание. *M* ± *SE* (min–max) – среднее ± ошибка среднего (минимальное–максимальное значения).

ствия [21, 22]. Кроме того, исследования уровня экспрессии микроРНК являются перспективным диагностическим методом для оценки реакции клеток на лучевую терапию [22].

Важно отметить, что превалирующее количество исследований как отечественных, так и зарубежных авторов, сосредоточены на оценке динамики изменения профиля экспрессии микроРНК в ответ на острое радиационное воздействие, вызванное облучением, как правило, в высоких, клинически значимых дозах. Однако с момента активного внедрения источников ИИ в повседневную жизнь человека, несомненно актуальными становятся исследования действия малых доз. На сегодняшний день одними из наиболее значимых факторов облучения человека в развитых странах являются медицинские источники ионизирующего излучения. Бесконтрольное использование медицинских диагностических процедур приводит к дополнительным кумулятивным дозовым нагрузкам для больших групп населения, эффекты которых до сих пор изучены недостаточно.

Таким образом, на сегодняшний день открытым остается вопрос модуляции экспрессии микроРНК малыми и средними дозами ионизирующего излучения, а также кинетика изменения уровня их экспрессии в отдаленный период после радиационного воздействия.

В настоящее исследование были включены четыре микроРНК: hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p, целевыми генами которых являются гены, контролирующие контрольные точки клеточного цикла и апоптоз, для которых показана экспрессия в цельной крови/сыворотке/плазме, а также зарегистрированы изменения их экспрессии в ответ на радиационное воздействие в высоких дозах *in vitro* на клеточных культурах или в условиях облучения *in vivo* пациентов, проходящих курсы лучевой терапии рака [20, 23–25].

Цель настоящей работы – оценка относительной экспрессии зрелых микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p в клетках периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому воздействию ионизирующего излучения в малых дозах в отдаленном периоде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследуемых лиц

Исследование экспрессии микроРНК проводилось у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на р. Тече (Южный Урал) в результате производственной деятельности ПО “Маяк” в 1950-х гг. и проживавших в одном из 40 сел, расположенных на побережье р. Течи, в период с 1950 по 1960 гг. [26]. Для всех обследованных лиц с использованием дозиметрической системы “Techa River Dosimetry System” (TRDS 2016 [27]) были рассчитаны индивидуальные поглощенные дозы облучения ККМ. В исследование не включались лица, имеющие онкологические, аутоиммунные, острые или хронические воспалительные заболевания в период обострения.

Всех обследуемых людей разделили на две группы. Основную группу составили 33 человека, в качестве группы сравнения исследованы 30 человек с поглощенной дозой облучения красного костного мозга (ККМ) не превышающей 70 мГр. Основные характеристики обследуемых лиц представлены в табл. 1.

Исследуемые группы гетерогенны по полу, возрасту и этническому составу. Как в основной группе, так и в группе сравнения в половом составе преобладают женщины. Этнический состав основной группы практически в равной степени представлен славянами и тюрками. В этническом составе группы сравнения незначительно преобладают этнические славяне.

От всех участников исследования было получено письменное информированное доброволь-

Таблица 2. Последовательности петлевых праймеров микроРНК hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, hsa-miR-21, hsa-miR-16-5p

МикроРНК	Последовательность петлевого праймера (5' → 3')	Размер, нк
hsa-miR-125b-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACA	50
hsa-miR-181a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACTCACC	51
hsa-miR-21-5p	GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACAGCCCA	56
hsa-miR-16-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA	50

ное согласие на проведение исследования, согласованное с этическим комитетом УНПЦ РМ.

США) в течение 30 мин при 16°C, 30 мин при 42°C, 5 мин при 85°C, затем охлаждали до 4°C.

Выделение РНК

Забор крови для оценки относительного содержания зрелых микроРНК, hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, hsa-miR-21, hsa-miR-16-5p проводился из локтевой вены в объеме 3 мл в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Thermo Scientific™, США). Выделение суммарной РНК осуществлялось при помощи коммерческого набора реагентов GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific™, США). Оценка количественных и качественных характеристик выделенных образцов суммарной РНК, содержащей фракцию зрелых микроРНК, проводилась при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, США). Чистоту препарата определяли по значениям поглощения на длинах волн, равных 260 и 280 нм (A260/280).

Обратная транскрипция

Реакцию обратной транскрипции суммарной РНК, содержащей фракцию зрелых микроРНК, проводили, используя коммерческий набор MMLV RT Kit (Евроген, Россия) с модификацией компонентов используемой смеси. В реакции обратной транскрипции микроРНК вместо линейных праймеров использовали специальные петлевые праймеры, последовательности которых были взяты из отечественных и зарубежных работ. Нуклеотидные последовательности данных праймеров представлены в табл. 2.

Реакционная смесь для обратной транскрипции микроРНК содержала образцы 5 мкл раствора выделенной РНК, 4 мкл 5× буфер для ОТ, 2 мкл 0.25 мМ каждого из dNTP, 2 мкл 20 мМ DTT, 1 мкл MMLV обратной транскриптазы, 2 мкл 10 мМ раствора соответствующего петлевого праймера, 2 мкл H₂O. Реакции объемом 20 мкл инкубировали в термоциклере Bio-RadC1000 (Applied Biosystems,

Полимеразная цепная реакция

Количественную ПЦР “в реальном времени” проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, в которую входило: 6 мкл 5× qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), по 0.5 мкл прямого и обратного праймеров (F, R), 1 мкл матрицы кДНК и 17 мкл деионизированной воды. Каждый образец анализировали в двух повторах. Температурно-временной режим и характеристики праймеров для ПЦР каждой исследуемой микроРНК представлены в табл. 3. Данные были проанализированы с помощью метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [28]. В качестве гена нормализатора использовали β -actin (ACTB). Расчет проводился с помощью программного обеспечения прибора Real-Time CFX96 Touch (“BioRad”, США).

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного комплекса Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение выборок данных проводили с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Корреляционный анализ с целью оценки влияния дозы облучения ККМ на показатели экспрессии микроРНК проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции (*R*) по Спирмену. Для оценки зависимости относительной экспрессии микроРНК от дозы облучения ККМ был проведен регрессионный анализ. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ данных экспрессии микроРНК

Результаты оценки относительного содержания микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-

Таблица 3. Температурно-временной режим ПЦР в реальном времени и характеристика праймеров для исследуемых микроРНК

МикроРНК	Последовательность праймера (5' → 3')	Размер, нк	Условия ПЦР-РВ
hsa-miR-125b-5p	F: GCGGCTCCCTGAGACCCTAAC	21	$\left. \begin{array}{l} 1. 95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин} \\ 2. 95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с} \\ 57^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с} \\ 72^{\circ}\text{C} - 25 \text{ с} \end{array} \right\} 45 \times$
	R: GTGCAGGGTCCGAGGT	16	
hsa-miR-181a-5p	F: GCGGCAACATTCAACGCTGTC	21	$\left. \begin{array}{l} 1. 95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин} \\ 2. 95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с} \\ 57^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с} \end{array} \right\} 45 \times$
	R: GTGCAGGGTCCGAGGT	16	
hsa-miR-21-5p	F: GCGGCAACACCAGTCGATG	19	$\left. \begin{array}{l} 1. 95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин} \\ 2. 95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с} \\ 60^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с} \end{array} \right\} 50 \times$
	R: TCGGTGTCGTGGAGT	16	
hsa-miR-16-5p	F: TTCGGTAGCAGCACGTAAATA	21	$\left. \begin{array}{l} 1. 95^{\circ}\text{C} - 10 \text{ мин} \\ 2. 95^{\circ}\text{C} - 15 \text{ с} \\ 57^{\circ}\text{C} - 45 \text{ с} \\ 72^{\circ}\text{C} - 20 \text{ с} \end{array} \right\} 45 \times$

5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p в исследуемых группах представлены на рис. 1. Как видно из рисунка, при сравнении двух исследуемых групп, были найдены статистически значимые различия в относительном содержании микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p и микроРНК hsa-miR-16-5p. Относительное содержание данных микроРНК в группе облученных лиц было статистически значимо выше, чем в группе сравнения. По сравнению с группой сравнения уровень экспрессии микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-16-5p и hsa-miR-181a-5p увеличен в 2.9, 3.5 и 1.5 раза соответственно. Исключение составили показатели, рассчитанные для микроРНК hsa-miR-21-5p, для которой не было получено статистически значимых различий с группой сравнения.

Методом корреляционного анализа была изучена связь между содержанием зрелых микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p и поглощенной дозой облучения ККМ. В группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, были выявлены слабые положительные корреляционные связи между относительным содержанием микроРНК hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-16-5p и hsa-miR-125b-5p и поглощенной дозой облучения ККМ ($R = 0.28$, $p = 0.03$; $R = 0.33$, $p = 0.01$ и $R = 0.28$, $p = 0.04$ соответственно).

Зависимость относительного содержания микроРНК от поглощенной дозы облучения ККМ также была исследована методом регрессионного

анализа. Результаты регрессионного анализа показали зависимость относительного содержания микроРНК от дозы, накопленной ККМ только для hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p ($R = 0.33$, $R^2 = 0.11$, $p = 0.01$ и $R = 0.27$, $R^2 = 0.08$, $p = 0.03$ соответственно). Для микроРНК hsa-miR-125b-5p подобная зависимость не выявлена ($R = 0.19$, $R^2 = 0.03$, $p = 0.16$). Зависимость относительной экспрессии исследуемых микроРНК от поглощенной дозы облучения ККМ проиллюстрирована на рис. 2. Сглаживание значений данных произведено с использованием метода скользящей средней, а данные на графиках представлены в виде средних групповых. Уравнение линии регрессии $y = a + bx$ представлено в виде прямой и рассчитано по индивидуальным показателям.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что микроРНК hsa-miR-125b, hsa-miR-181a и hsa-miR-16 могут играть важную роль в ответе на радиационное воздействие путем нацеливания на гены, белковые продукты которых принимают участие в защите клетки от облучения. Основной механизм действия микроРНК заключается в том, что микроРНК в составе белкового комплекса с высокой специфичностью связывается с комплементарным участком в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК-мишени (целевого гена) [29]. Активность микроРНК дифференцирована — если комплементарность не абсолютная, целевая

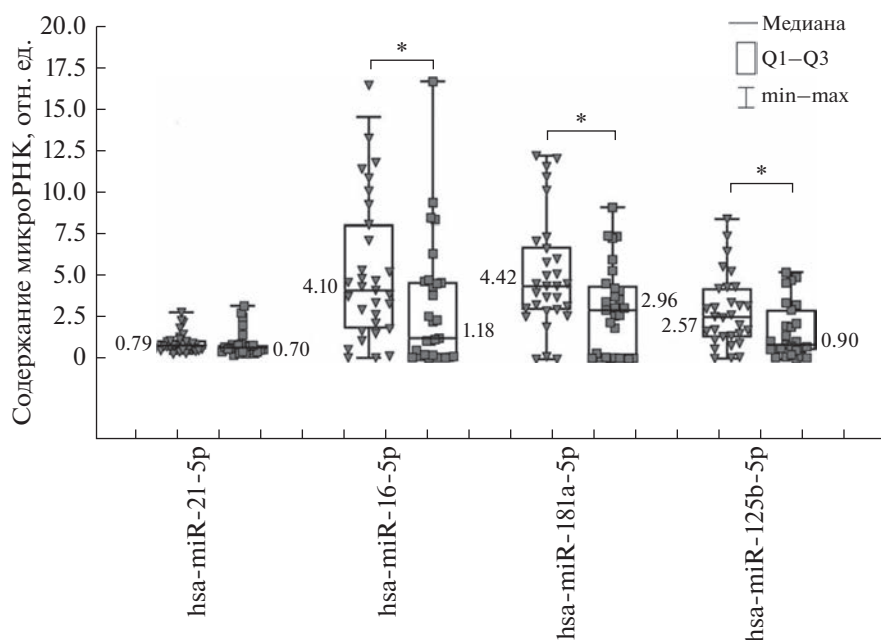


Рис. 1. Относительное содержание микроРНК hsa-miR-21-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-125b-5p (отн. ед.) в группах обследуемых лиц. ■ – облученные лица, ▼ – группа сравнения, * – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0.05$).

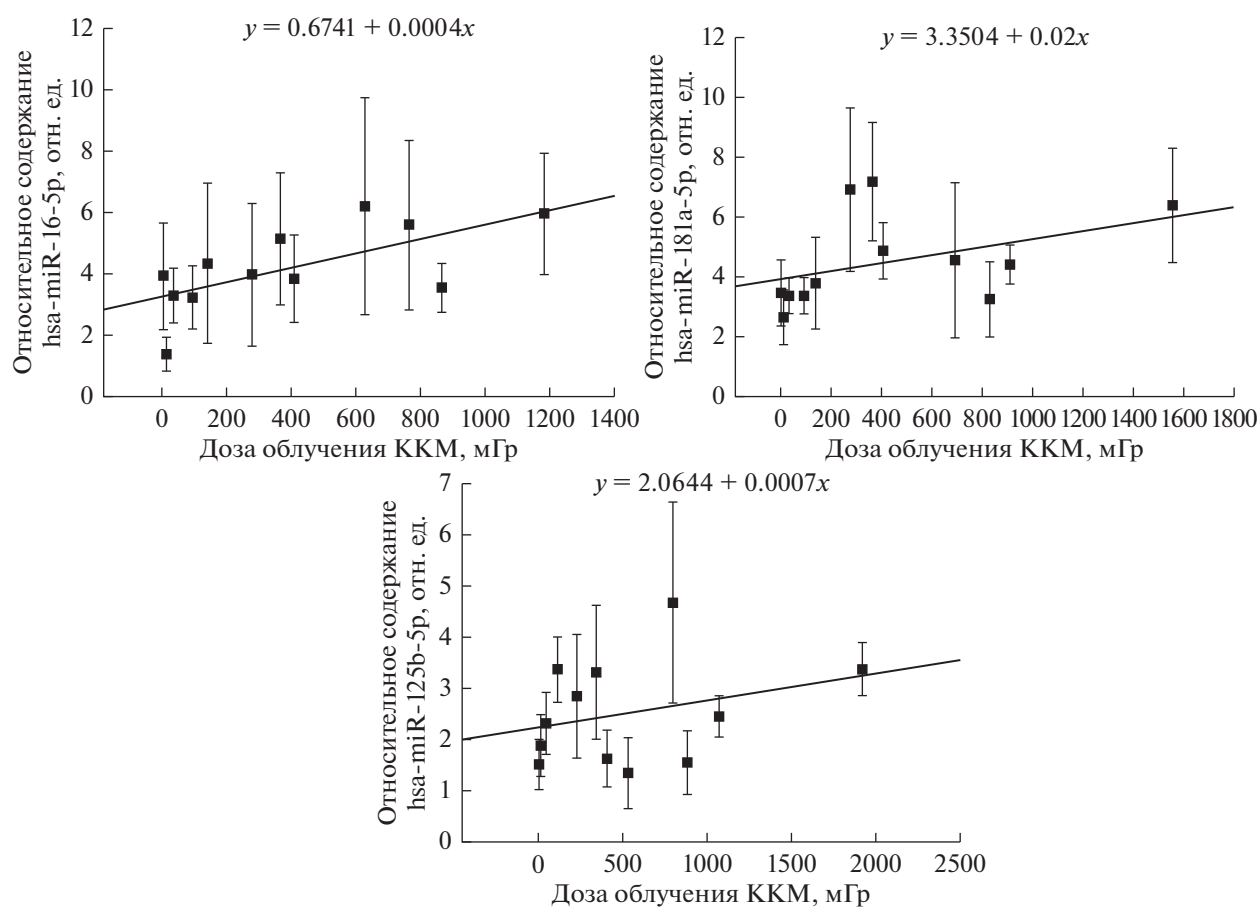


Рис. 2. Зависимость относительного содержания микроРНК hsa-miR-16-5p, hsa-miR-181a и hsa-miR-125b от дозы облучения ККМ.

мРНК может не деградировать, а только обратимо блокироваться, но при этом нарушается синтез белка. Кроме того, действие микроРНК может кардинально отличаться в зависимости от состояния клетки. При определенных клеточных состояниях, таких как остановка клеточного цикла в G0/G1, клеточный стресс или нехватка питательных веществ, микроРНК также могут индуцировать активацию трансляции [30].

Представленные в работе результаты показывают, что экспрессия микроРНК может модулироваться в клетках крови в ответ на радиационное воздействие в диапазоне малых и средних доз. В результате исследования относительного количества зрелых микроРНК в цельной крови людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, были выявлены статистически значимые различия в экспрессии ряда микроРНК. Наблюдалась повышенная экспрессия микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p в группе облученных лиц, с дозами облучения ККМ от 77.7 до 2869.8 мГр (среднее значение – 698.5 мГр). Отмечены слабые корреляционные связи микроРНК hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p с дозой облучения ККМ.

МикроРНК, исследуемые в данной работе наиболее активно изучают в контексте оценки радиорезистентности опухолей и прогнозировании ответа на лучевую терапию рака, где дозовый диапазон значительно отличается от представленного в настоящем исследовании. Так, например имеющиеся данные свидетельствуют о том, что микроРНК hsa-miR-16, регулирующая клеточный цикл, пролиферацию, апоптоз и онкогенность *in vitro* и *in vivo*, может повышать чувствительность клеток к облучению, регулируя сигнальный путь TLR1/NF-κB, и действует как потенциальный терапевтический подход для преодоления радиорезистентности при лечении рака [31]. Показано, что у пациентов, получавших лучевую терапию при плоскоклеточном раке пищевода (средняя доза облучения составила 60.2 ± 9.1 Гр при дозе 2 Гр в день, 5 дней в неделю) уровень микроРНК hsa-miR-16 плазмы крови увеличился более чем в 2 раза.

С другой стороны, для микроРНК hsa-miR-181a, hsa-miR-125b в литературе показано снижение их экспрессии в ответ на радиационное воздействие в высоких, клинически значимых дозах. Так, при облучении *in vitro* клеточной линии глиобластомы U87MG рентгеновскими лучами в дозе 18.8 Гр наблюдалось снижение экспрессии hsa-miR-181a ($p < 0.05$) [32]. Снижение экспрессии hsa-miR-125b было отмечено в работе [33] при облучении *in vitro* раковой клеточной линии предстательной железы DU-145 после однократного гамма-облучения в дозе 4 Гр.

В то же время в периферической крови пациентов, в отдаленные сроки (спустя несколько де-

сятков лет), перенесших острую лучевую болезнь (ОЛБ), получивших местные лучевые поражения (МЛП), а также ОЛБ + МЛП не обнаружено изменение в экспрессии зрелых микроРНК hsa-miR-16, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, однако у пациентов, перенесших только ОЛБ наблюдалось снижение содержания микроРНК hsa-miR-21 [34].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, демонстрирующие наоборот, активацию микроРНК hsa-miR-16, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p, вероятно обусловлены особенностями радиационного воздействия (хроническое радиационное облучение в диапазоне малых и средних доз), которому подверглись жители прибрежных сел р. Течи. Следует подчеркнуть, что относительное содержание микроРНК hsa-miR-21, которая регулирует клеточную выживаемость после облучения, включая оксидативный метаболизм, задержку клеточного цикла, апоптоз и другие важнейшие клеточные процессы, у облученных лиц не отличалось от такового в группе сравнения.

Изменение экспрессии микроРНК может отражаться на транскрипционной активности генов-мишеней. В частности, для исследуемых нами микроРНК hsa-miR-16, hsa-miR-181a, hsa-miR-125b показана негативная регуляция антиапоптотического гена *BCL-2* [35]. Важно отметить, что *BCL-2* участвует в клеточном ответе на облучение, являясь центральной фигурой множества регуляторных систем клетки, таких как апоптоз, пролиферация и поддержание генетической стабильности в опухолевых клетках. Кроме того, микроРНК hsa-miR-181a может модулировать (усиливать или ингибировать) апоптотическую гибель клеток прямым взаимодействием с генами *ATM*, *K-Ras*, *BCL-2* [2].

Ранее у облученных жителей прибрежных сел р. Течи было зарегистрировано снижение уровня мРНК гена *BCL-2* [36]. Можно предположить, что наблюдаемый эффект обусловлен взаимодействием исследуемых нами микроРНК с мРНК-мишенью *BCL-2* в 3'-UTR области, с последующим ее деаденилированием и декапированием, результатом чего может являться деградация транскрипта и, как следствие, регистрируемое снижение количества мРНК [29, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отдаленные сроки (спустя 60 лет после начала обучения) в широком диапазоне доз 77.7–2869.8 (698.5 ± 103.3) облучения ККМ у жителей прибрежных сел р. Течи зарегистрировано повышение экспрессии микроРНК hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181a-5p и hsa-miR-16-5p.

Результаты исследования позволяют предположить возможное участие микроРНК в модуляции таких клеточных процессов как клеточный

цикл, апоптоз и пролиферация в период реализации отдаленных канцерогенных и неканцерогенных эффектов у жителей прибрежных сел р. Течи. Однако для уточнения и подтверждения результатов, полученных в настоящей работе, необходимо увеличить объем выборки исследуемых лиц.

Финансирование работы осуществлялось в рамках федеральной целевой программы “Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года”.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 1. P. 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
2. Mao A., Liu Y., Zhang H. et al. microRNA expression and biogenesis in cellular response to ionizing radiation // *DNA and Cell Biology.* 2014. V. 33. № 10. P. 667–679. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2401>
3. Pashaei E., Pashaei E., Ahmady M. et al. Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179543>
4. Adhami M., Haghdoust A.A., Sadeghi B. et al. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: A systematic review // *Breast Cancer.* 2018. V. 25. № 2. P. 198–205. <https://doi.org/10.1007/s12282-017-0814-803>
5. Pardini B., De Maria D., Francavilla A. et al. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. № 1. P. 696. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4590-4>
6. Shao C., Yang F., Qin Z. et al. The value of miR-155 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer: A systematic review with meta-analysis // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 1. P. 1103. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6297-6>
7. Ромакина В.В., Жиров И.В., Насонова С.Н. и др. МикроРНК как биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний // *Кардиология.* 2018. Т. 58. № 1. С. 66–71. <https://doi.org/10.18087/cardio.2018.1.10083>
8. Otsuka M., Kishikawa T., Yoshikawa T. et al. MicroRNAs and liver disease // *J. Hum. Genet.* 2016. V. 62. P. 75–80. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.53>
9. Zhang Y., Jia Y., Zheng R. et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. № 12. P. 1830–1838. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147850>
10. Metheetraitrit C., Slack F.J. MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy // *Curr. Op. in Genet. & Development.* 2013. V. 23. № 1. P. 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.01.002>
11. Jacob N.K., Cooley J.V., Yee T.N. et al. Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation biodosimetry // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057603>
12. Chaudhry M.A., Omaruddin R.A., Kreger B. et al. MicroRNA responses to chronic or acute exposures to low dose ionizing radiation // *Mol. Biol. Reports.* 2012. V. 39. № 7. P. 7549–7558. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1589-9>
13. Simone N.L., Soule B.P., Ly D. et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression // *PLoS One.* 2009. V. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006377>
14. Shin S., Cha H.J., Lee E.M. et al. Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells // *Int. J. Oncol.* 2009. V. 35. № 1. P. 81–86.
15. Chaudhry M.A. Real-time PCR analysis of microRNA expression in ionizing radiation-treated cells // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2009. V. 24. № 1. P. 49–56. <https://doi.org/10.1089/cbr.2008.0513>
16. Song M., Xie D., Gao S. et al. A biomarker panel of radiation-upregulated miRNA as signature for ionizing radiation exposure // *Life (Basel).* 2020. V. 10. № 12. P. 361. <https://doi.org/10.3390/life10120361>
17. Templin T., Paul S., Amundson S.A. et al. Radiation-induced microRNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients // *Int. J. of Rad. Oncol., Biol., Physics.* 2011. V. 80. № 2. P. 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.061>
18. Weidhaas I., Babar S.M., Nallur P. et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 23. P. 11111–11116.
19. Maes O.C., An J., Sarojini H. et al. Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation // *J. Cell Biochem.* 2008. V. 105. № 3. P. 824–834. <https://doi.org/10.1002/jcb.21878>
20. Templin T., Paul S., Amundson S.A. et al. Radiation-induced micro-RNA expression changes in peripheral blood cells of radiotherapy patients // *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 2011. V. 80. № 2. P. 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.12.061>
21. Lacombe J., Sima C., Amundson S.A., Zenhausem F. Candidate gene biodosimetry markers of exposure to external ionizing radiation in human blood: A systematic review // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198851>
22. Jacob N.K., Cooley J.V., Yee T.N. et al. Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation

- biodosimetry // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057603>
23. Chen G., Zhu W., Shi D. et al. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting *Bcl-2* // *Oncol. Reports*. 2010. V. 23. № 4. P. 997–1003. https://doi.org/10.3892/or_00000725
 24. Beer L., Seemann R., Ristl R. et al. High dose ionizing radiation regulates micro RNA and gene expression changes in human peripheral blood mononuclear cells // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 814. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-814>
 25. Sun Y., Hawkins P.G., Bi N. et al. Serum microRNA signature predicts response to high-dose radiation therapy in locally advanced non-small cell lung cancer // *Int. J. of Rad. Oncol., Biol., Physics*. 2018. V. 100. № 1. P. 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.08.039>
 26. Силкин С.С., Крестинина Л.Ю., Старцев В.Н. и др. Уральская когорта аварийно-облученного населения // *Медицина экстрем. ситуаций*. 2019. Т. 21. № 3. С. 393–402.
 27. Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I. et al. Enhancements in the Techa River dosimetry system: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures // *Health Physics*. 2019. V. 117. № 4. P. 378–387. <https://doi.org/10.1097/HP.0000000000001067>
 28. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 29. Riolo G., Cantara S., Marzocchi C., Ricci C. miRNA targets: From prediction tools to experimental validation // *Meth. and Protocols*. 2020. V. 4. № 1. <https://doi.org/10.3390/mps4010001>
 30. Stroynowska-Czerwinska A., Fiszer A., Krzyzosiak W.J. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells // *Cell. and Mol. Life Sci*. 2014. V. 71. № 12. P. 2253–2270. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1551-6>
 31. Aqeilan R.I., Calin G.A., Croce C.M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives // *Cell Death Differ*. 2010. V. 17. № 2. P. 215–220. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.69>
 32. Chen G., Zhu W., Shi D. et al. MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting *Bcl-2* // *Oncol. Reports*. 2010. V. 23. № 4. P. 997–1003. https://doi.org/10.3892/or_00000725
 33. Махоткин М.А., Чеботарев Д.А., Тютякина М.Г. и др. Роль микроРНК в развитии радиорезистентности клеток рака предстательной железы (экспериментальное исследование) // *Онкоурология*. 2021. Т. 17. № 4. С. 85–93. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2021-17-4-85-93>
 34. Шуленина Л.В., Михайлов В.Ф., Васильева И.М. и др. Профили экспрессии генов и некодирующих РНК в биоптатах тканей и клетках крови пациентов с разной патологией после радиационного воздействия // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2019. № 1. С. 103–109.
 35. Yang D., Zhan M., Chen T. et al. miR-125b-5p enhances chemotherapy sensitivity to cisplatin by down-regulating *Bcl2* in gallbladder cancer // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. <https://doi.org/10.1038/srep43109>
 36. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов // *Радиация и риск (Бюлл. Нац. рад.-эпидем. регистра)*. 2020. Т. 29. № 2. С. 89–100.

Effect of Chronic Radiation Exposure on Human microRNA Expression

M. A. Yanishevskaya^{a, *}, E. A. Blinova^{a, b}, and A. V. Akleyev^{a, b}

^aUrals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, 454141 Russia

^bChelyabinsk State University, Chelyabinsk, 454001 Russia

*e-mail: yanishevskaya@urcrm.ru

Relative expression of mature microRNA assessed in peripheral blood cells in persons chronically exposed to low-dose radiation in the long-term period. The study included people exposed in the 1950s on the Techa River (Southern Urals, Russia). The cumulative red bone marrow doses (RBM) of the persons in the main study group (33 persons) ranged from 77.7 to 2869.8 mGy (mean value – 698.5 mGy). The comparison group consisted of 30 people with RBM dose not exceeding 70 mGy over their lifetime. Reverse transcription of RNA samples was performed using specific stem-loop primers (“stem-loop”). Changes in the relative content of microRNA were assessed by real-time PCR on the CFX96 detection system (BioRad, USA). Statistical analysis of the results was performed using Mann–Whitney U-criterion. A significant increase in hsa-miR-125b, hsa-miR-181a, and hsa-miR-16-5p content was detected in exposed people after 60 years, and their expression was found to depend on the RBM dose.

Keywords: microRNA, expression, PCR, the Techa River, chronic exposure, radiation exposure.