

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ
ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ՏԻԳՐԱՆ ԱՇՈՏԻ

**ԳԵՆՈՄԱՅԻՆ ԱՆԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՄԱՐԿԵՐՆԵՐԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ
ՄԱՐԴՈՒ ԲԶԻԶՆԵՐՈՒՄ**

Գ.00.15 - «Գենետիկա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների դոկտորի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2026

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АРУТЮНЯН ТИГРАН АШОТОВИЧ

**РАЗРАБОТКА БИОМАРКЕРОВ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ В
КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук по специальности
03.00.15 - «Генетика»

ЕРЕВАН – 2026

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում:

Գիտական խորհրդատու՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ.գ.դ., պրոֆ.
Ռուբեն Միքայելի Հարությունյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

կ.գ.դ., պրոֆ. Կարինե Ռաֆիկի Մայիլյան
կ.գ.դ., պրոֆ. Աստղիկ Զավենի Փեփոյան
կ.գ.դ., պրոֆ. Տատյանա Պավելի Շկուրատ

Առաջատար կազմակերպություն՝

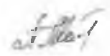
ՌԴ Ա.Ի. Բուռնազյանի անվան դաշնային
բժշկական կենսաֆիզիկայի գիտական
կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2026թ. օգոստոսի 31-ին, ժամը 12⁰⁰-ին Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2026թ. հուլիսի 27-ին:

051 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, կ.գ.դ., դոցենտ՝



Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный консультант:

член-корр. НАН РА,
д.б.н., проф. Рубен Михайлович Арутюнян

Официальные оппоненты:

д.б.н., проф. Асттик Завеновна Пепоян
д.б.н., проф. Карине Рафиковна Маилян
д.б.н., проф. Татьяна Павловна Шкурат

Ведущая организация:

Федеральный медицинский биофизический
центр имени А.И. Бурназяна, РФ

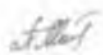
Защита диссертации состоится 31-го августа 2026г. в 12⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 051 по Биофизике при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 27-го июля 2026г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051

д.б.н., доцент



М. А. Парсаданян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние десятилетия усиливающееся воздействие физических, химических и биологических факторов окружающей среды сопровождается выявлением новых генотоксических эффектов, что обуславливает необходимость совершенствования подходов к их оценке и прогнозированию риска для здоровья человека.

Важнейшими маркерами генотоксического влияния являются биомаркеры геномной нестабильности, которая проявляется на различных уровнях организации генома – от нуклеотидных изменений и повреждений ядерной и митохондриальной ДНК (мтДНК) до структурных хромосомных изменений, включающих интерстициальные перестройки (в том числе вариации числа копий ДНК, DNA copy number variation — CNV) и терминальные нарушения, связанные с дисфункцией теломер (Gemoll et al., 2015; Singh et al., 2017; Bonora et al., 2021; Narutyunyan, 2024). Геномная нестабильность лежит в основе широкого спектра патологических процессов, включая канцерогенез, хроническое воспаление, вирусные инфекции и старение. В этой связи биомаркеры геномной нестабильности приобретают особую значимость как количественные и прогностические инструменты оценки повреждений генома (Gemoll et al., 2015; Reis et al., 2016; Adams et al., 2024). В связи с этим разнообразие механизмов генотоксического действия и клеточная гетерогенность ответов требуют оперативной разработки и использования комплексных панелей биомаркеров, отражающих как экзогенные, так и эндогенные механизмы дестабилизации генома.

Одним из ключевых экзогенных факторов геномной нестабильности является ионизирующая радиация. Генетический мониторинг радиационно-индуцированной нестабильности основан на количественной оценке хромосомных повреждений (Anderson et al., 2019), которые неравномерно распределяются по геному и клеточной популяции (Lin et al., 2019). При этом распределение интерстициальных и терминальных повреждений хромосом может варьировать в зависимости от линейной передачи энергии излучения (Darroudi et al., 2002; Anderson et al., 2005; Shim et al., 2014; Durante and Formenti, 2018), что диктует необходимость комплексного молекулярно-цитогенетического анализа с учетом клеточной гетерогенности.

При изучении радиационно-индуцированной нестабильности крайне важно использовать калиброванные источники радиации. В последние годы были разработаны лазерные ускорители электронов, формирующие ультракороткие (фемто- и пикосекундные) моноэнергетические пучки с минимальным боковым рассеиванием (Babayan et al., 2020). Ультракороткая длительность импульса, сопоставимая или меньшая, чем продолжительность радиационно-индуцированных химических процессов, может вызывать специфические радиобиологические эффекты. По этой причине особую актуальность представляет комбинированный анализ CNV и укорочение теломер методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). CNV возникают вследствие делеций или дупликаций участков генома, связанных с ошибками репарации двунитевых разрывов ДНК и репликативного стресса (Arlt et al., 2014). Теломеры характеризуются повышенной чувствительностью к окислительному стрессу из-за многочисленных гуаниновых повторов (Bolzán, 2021; Iskandar et al., 2025). Таким образом, FISH анализ локус-специфических CNV и изменения длины теломер является целесообразным подходом для выявления неравномерной чувствительности различных участков генома к действию радиации и клеточной гетерогенности.

Неравномерное распределение повреждений ДНК характерно также для митохондриального генома (Zhou et al., 2012). В связи с отсутствием защитных гистонов, ограниченными механизмами репарации и близостью к источникам активных форм кислорода, мтДНК рассматривается как высокочувствительная мишень генотоксических факторов (Cline et al., 2012). Особый интерес в этом контексте представляет доксорубидин (DOX) – противоопухолевый препарат, индуцирующий двухцепочечные разрывы ДНК и

накапливающийся в митохондриях, что усиливает окислительный стресс и вызывает повреждение мтДНК (Wallace et al., 2020). Повреждённая мтДНК может высвободиться в цитоплазму или во внеклеточное пространство (Ariyoshi et al., 2019; Leuthner and Meyer, 2021; Shimura et al., 2025), активировать воспалительные сигнальные пути, тем самым усиливая оксидативный стресс (Aloraini, 2025), и способствовать образованию двухцепочечных разрывов ДНК. Репарация таких повреждений может приводить к образованию *de novo* инсерций мтДНК в ядерном геноме (Srinivasainagendra et al., 2017). Таким образом, мтДНК выступает не только маркером, но и активным медиатором геномной нестабильности, что обуславливает необходимость стандартизированного подхода к её использованию в качестве биомаркера.

Одним из ключевых эндогенных факторов, обеспечивающих поддержание геномной стабильности, является компактизация хроматина, регулируемая гистоновыми белками (Caeiro et al., 2024). Пространственная организация ДНК определяет доступность генома для репликации и репарации, а её дестабилизация сопровождается повышением уровня повреждений ДНК и геномной нестабильности (Miloshev et al., 2025). Особую роль в формировании высших уровней компактизации играют линкерные гистоны семейства H1. Изменение их экспрессии или структуры может приводить к нарушению процессов репликации и репарации ДНК и повышению чувствительности клеток к генотоксическим воздействиям (Ozgencil et al., 2023). Нокаут гена H1-5 ассоциирован с дезорганизацией центромерного хроматина, дефектами формирования митотического аппарата и накоплением отстающих хромосом (Saha et al., 2026), что приводит к образованию микроядер (Gomes et al., 2022). В связи с этим нокаут H1-5 с использованием CRISPR-Cas9 является перспективным инструментом для изучения механизмов поддержания геномной стабильности.

Разработка маркеров геномной нестабильности в системе *in vitro* требует их верификации в условиях *in vivo* для оценки клинической значимости и прогностической ценности, а также диагностической чувствительности и специфичности в условиях целостного организма. В этом контексте COVID-19 представляет собой модель системного генотоксического воздействия (Abiri et al., 2025) с выраженной клинической вариабельностью — от бессимптомных форм до тяжёлых состояний. Тяжёлое течение заболевания сопровождается гипервоспалительным ответом и усилением оксидативного стресса, что приводит к повреждению ДНК в ядерном (Zhang et al., 2024) и митохондриальном геноме (Shteinfer-Kuzmine et al., 2024).

Геномная нестабильность при COVID-19 проявляется одно- и двунитевыми разрывами ДНК, укорочением теломер и повышением уровней окислительных модификаций ДНК, включая 8-OHdG (Valdés-Aguayo et al., 2021; Mihaljevic et al., 2022; Vos et al., 2025). Стратифицированный анализ этих маркеров, с учётом тяжести течения болезни, пола и возраста пациентов, позволяет оценить их вклад в клинические проявления патологии и обосновывает использование данной модели для изучения взаимосвязи клинических показателей и геномной нестабильности.

Таким образом, разработка и валидация системы биомаркеров, отражающих универсальные механизмы повреждения генетического материала, которые приводят к геномной нестабильности, является необходимым условием для объективной оценки действия генотоксических факторов различной природы и их вклада в развитие патологических состояний.

Целью исследования являлась разработка системы биомаркеров геномной нестабильности, индуцированной физическими и химическими факторами в клетках человека *in vitro*, и методологических подходов к оценке их клинической значимости *in vivo*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Обнаружить интерстициальные повреждения хромосом путем анализа вариаций числа копий ДНК (CNV), индуцированные облучением ускоренными электронами, и наиболее чувствительные к данному фактору хромосомные локусы с использованием метода FISH.
2. Описать терминальные повреждения хромосом на основе анализа изменений длины теломер, индуцированных облучением ускоренными электронами, с применением метода FISH.
3. Выявить клеточную гетерогенность при действии облучения ускоренными электронами на основе анализа CNV и длины теломер.
4. Разработать и применить новые молекулярно-цитогенетические биомаркеры геномной нестабильности и с использованием анализа CNV и изменения длины теломер.
5. Синтезировать FISH-зонд специфический для мтДНК человека методом DOP-ПЦР.
6. Выявить доксорубидин-индуцированные инсерции мтДНК в хромосомах человека, а также мутации нативной мтДНК и уровни внеклеточной мтДНК.
7. Разработать новые молекулярно-генетические биомаркеры геномной нестабильности на основе мтДНК.
8. Разработать клеточные линии с геномной нестабильностью для тестирования химических мутагенов.
9. Выявить роль гена линкерного гистона *H1-5* в обеспечении стабильности генома с использованием CRISPR-Cas9 и оценить чувствительность биомаркеров геномной нестабильности в клетках с отредактированным геномом.
10. Выделить биомаркеры геномной нестабильности с клинической значимостью, предсказывающие степень манифестации заболевания в группах пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19.
11. Определить пороговые значения биомаркеров геномной нестабильности, дискриминирующие пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19.
12. Обосновать прогностическое значение биомаркеров геномной нестабильности при воздействии мутагенных факторов и при инфекционных заболеваниях человека.
13. На основе полученных результатов предложить концепцию оценки геномной нестабильности в клетках человека при генотоксических воздействиях и патологических состояниях.

Научная новизна

1. Разработана комплексная система молекулярно-цитогенетической оценки генотоксических эффектов облучения ультракороткими импульсами ускоренных электронов, что позволило впервые выявить распределения интерстициальных и терминальных повреждений хромосом на основе анализа CNV и вариаций длины теломер, соответственно. Выявлены чувствительные к облучению ускоренными электронами хромосомные локусы CNV, и проценты чувствительности и специфичности пороговых значений CNV и длины теломер для моделирования молекулярно-цитогенетических эффектов облучения ускоренными электронами. Установлено, что CNV и укорочение теломер отражают неодинаковую чувствительность различных участков генома к действию радиации, что позволяет рассматривать локус-специфический и теломерный FISH анализ как инструмент выявления неравномерного распределения повреждений в геноме.

2. Показано, что теломеры в лейкозных клетках короче и проявляют более выраженную дозозависимую чувствительность к облучению ускоренными электронами по сравнению с нормальными лейкоцитами крови человека, что позволяет рассматривать теломерные участки в качестве молекулярных мишеней в клетках лейкоза.
3. Впервые выявлены *de novo* инсерции мтДНК в хромосомах человека индуцированные противоопухолевым препаратом доксорубицином (DOX). Разработан молекулярно-генетический подход к синтезу ДНК-зондов к мтДНК для FISH анализа, позволяющий визуализировать хромосомное распределение DOX-индуцированных инсерций мтДНК и их корреляцию с уровнями микроядер, что позволяет рассматривать повреждения хромосом как важного фактора для образования инсерций мтДНК в хромосомах и нумтогенеза. Установлена положительная корреляция числа инсерций мтДНК с размером хромосом, что свидетельствует о случайном характере их распределения.
4. Впервые показано, что DOX индуцирует повреждения мтДНК и образование внеклеточных фрагментов мтДНК в нормальных лейкоцитах и лейкозных клетках. Показаны неперекрывающиеся участки DOX-индуцированных мутаций в клеточной мтДНК, отражающие межклеточную вариабельность и гетерогенный характер повреждений митогенома. Идентифицированы преобладающие DOX-индуцированные фрагменты внеклеточной мтДНК, что указывает на их потенциальную значимость в качестве биомаркеров DOX-индуцированной генотоксичности.
5. Внедрение метода редактирования генома CRISPR-Cas9 в Армении позволило впервые показать, что подавление экспрессии гена линкерного гистона *H1-5* повышает уровни повреждений хромосом и ДНК в нормальных и раковых клетках человека. Показана повышенная DOX-индуцированная геномная нестабильность в клетках с нокдауном по сравнению с клетками дикого типа, что позволяет предположить о потенциальном значении анализа экспрессии гена *H1-5* для корректировки дозы DOX при лечении опухолей с мутацией этого гена.
6. Разработана система биомаркеров геномной нестабильности для оценки вклада различных типов повреждений ДНК в клинические проявления заболевания и обосновано использование данной модели для изучения взаимосвязи клинических показателей и геномной нестабильности в группах пациентов с COVID-19 в зависимости от тяжести заболевания, пола и возраста пациентов. Установлены пороговые значения и проведён стратифицированный ROC-анализ показателей геномной нестабильности у пациентов с COVID-19, продемонстрировавший дискриминирующую способность % ДНК в хвосте, длины теломер лейкоцитов и букальных клеток, а также уровней 8-OHdG для различения как здоровых лиц и пациентов, так и пациентов средней и тяжёлой степени тяжести, с учётом пола и возраста. Впервые выявлены независимые факторы геномной нестабильности и их уровни чувствительности и специфичности в зависимости от тяжести заболевания, пола и возраста пациентов COVID-19.
7. Показаны различия в скорости укорочения теломер лейкоцитов между здоровыми и больными COVID-19, а также в зависимости от тяжести заболевания. Установлена позитивная корреляция между длиной теломер лейкоцитов и уровнем 8-OHdG в плазме, что позволяет предположить о вкладе окислительных повреждений теломер при COVID-19.

Практическая ценность работы.

1. На основании проведённого исследования обоснована целесообразность комплексной молекулярно-цитогенетической оценки геномной нестабильности с применением сочетанного анализа локус-специфических CNV и длины теломер методом FISH при воздействии ультракоротких импульсов ускоренных электронов. Предложенный подход может рассматриваться как чувствительная тест-система для количественной регистрации интерстициальных и терминальных повреждений хромосом при радиационном воздействии. Полученные результаты подтверждают информативность сравнительного анализа теломер в нормальных и опухолевых клетках для оценки их различной чувствительности к ионизирующему излучению, что может быть использовано при экспериментальном моделировании радиобиологических эффектов.
2. Разработанный нами молекулярно-генетический подход к выявлению DOX-индуцированных инсерций мтДНК в хромосомы человека и анализ внеклеточной мтДНК расширяют возможности оценки генотоксического действия противоопухолевых препаратов и могут применяться при исследовании механизмов индуцированной геномной нестабильности.
3. Внедрение технологии CRISPR-Cas9 для подавления экспрессии гена *H1-5* позволяет использовать полученную модель в исследованиях механизмов поддержания геномной стабильности и при анализе чувствительности клеток к генотоксическим факторам.
4. Определение пороговых значений, а также оценка чувствительности и специфичности маркеров геномной нестабильности в группах пациентов, стратифицированных по тяжести заболевания, полу и возрасту, обеспечивают количественную основу для клинической интерпретации уровней повреждения ДНК *in vivo*.

Таким образом, разработанная система биомаркеров геномной нестабильности формирует методологическую основу для дальнейшей стандартизации количественных подходов к оценке генотоксических воздействий различной природы и их клинической интерпретации *in vivo*, создавая предпосылки для развития трансляционных исследований в области радиобиологии, генетической токсикологии и молекулярной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комбинированный локус-специфический анализ CNV и длины теломер методом FISH позволяет дифференцированно оценивать интерстициальные и терминальные повреждения хромосом и выявлять неодинаковую чувствительность различных участков генома к действию ультракоротких импульсов ускоренных электронов.
2. Теломерные участки опухолевых клеток характеризуются более выраженной дозозависимой чувствительностью к облучению ускоренными электронами по сравнению с нормальными клетками крови, что отражает различия в устойчивости генома нормальных и трансформированных клеток.
3. Генотоксическое действие доксорубина затрагивает митогеном и сопровождается межклеточной вариабельностью и гетерогенным характером повреждений клеточной мтДНК, а также появлением преобладающих фрагментов внеклеточной мтДНК, обладающих биомаркерным потенциалом.
4. Доксорубин индуцирует *de novo* инсерции мтДНК в хромосомы человека; анализ хромосомного распределения таких инсерций методом FISH позволяет

оценивать особенности их локализации и связи с уровнем хромосомных повреждений.

5. Подавление экспрессии гена линкерного гистона *H1-5* повышает уровни биомаркеров геномной нестабильности в нормальных и опухолевых клетках и усиливает DOX-индуцированную геномную нестабильность по сравнению с клетками дикого типа.
6. Показатели геномной нестабильности (разрывы ДНК, длина теломер, уровни 8-OHdG) обладают диагностической и прогностической значимостью при оценке тяжести течения COVID-19; их стратифицированный анализ с учётом пола и возраста отражает вклад геномной нестабильности в клинические проявления заболевания.
7. Определение пороговых значений показателей геномной нестабильности и оценка их чувствительности и специфичности позволяют количественно дискриминировать клинические группы и оценивать вклад геномной нестабильности в тяжесть патологического процесса *in vivo*.

Апробация работы. Результаты, вошедшие в работу, были представлены и доложены на 3rd International Congress «CRISPR-2025» (Ереван, Армения, 5 – 10 октября, 2025 г.), на Международной конференции «Biological Sciences and Environmental Solutions for the Achievement of Sustainable Development Goals» (Ереван, Армения, 24 – 26 сентября, 2025 г.), на NATO Advanced Research Workshop «Low Dose Radiation Risks: Present Research and Future Perspectives» (Ереван, Армения, 30 марта – 2 апреля, 2025 г.), на Армянском совещании «Climate Changes: Adaptation» (Ереван, Армения, 27 – 28 марта, 2023 г.), на V Международной конференции, посвящённой Н.В. Тимофееву-Ресовскому и его научной школе «Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution» (Нор Амберд, Армения, 5 – 10 октября, 2021 г.), на Международной конференции «Современные вопросы радиационной генетики» (Дубна, Россия, 27 – 28 июня, 2019 г.) и на конференции «BRITE: Biomarkers of Radiation in the Environment – Robust Tools for Risk Assessment» (Ереван, Армения, 2017 г.). По теме диссертации опубликовано 16 статей, 10 тезисов, 3 главы в книгах и одна монография.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 233 страницах, состоит из списка использованных сокращений, введения, обзора литературы, описания методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 81 рисунок и 37 таблицы. Автор выражает глубокую благодарность за ценные советы и помощь в проведении совместных исследований проф. Г.Г. Оганесян, к.б.н. А.А. Саргсян, к.ф.-м.н. Б.А. Григорян, д.-ру Н.С. Степанян, проф. Т. Лиру и коллективам кафедры генетики и цитологии биологического факультета, и лаборатории общей и молекулярной генетики института биологии ЕГУ.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, показаны ее научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает подробный анализ маркеров геномной нестабильности на уровне нуклеотидов, вариаций числа копий ДНК, повреждений ДНК, хромосом и теломер, внеклеточной ДНК, методы анализа повреждений ДНК и хромосом. Описаны основные механизмы генотоксичности ионизирующего излучения и химических мутагенов, а также генотоксические эффекты вирусных инфекций и инсерций мтДНК в

хромосомах человека. Обсуждены трансляционные подходы для интегрирования данных геномной нестабильности в клиническую практику.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты с диагнозом коронавирусной инфекции. Образцы крови, буккальные клетки и клинические данные больных COVID-19 были предоставлены Национальным центром инфекционных болезней Министерства здравоохранения Республики Армения. Исследования с использованием биоматериалов пациентов с COVID-19 и здоровых доноров проводились в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и были одобрены этическим комитетом Института молекулярной биологии НАН РА (IRB00004079, IORG0003427; код одобрения №05/2021 от 11 октября 2021 г.; №07/2022 от 30 сентября 2022 г.). В исследование были включены 65 пациентов, госпитализированных с подтверждённой инфекцией SARS-CoV-2, установленной методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Все пациенты и здоровые доноры были старше 18 лет. Исследование проводилось при наличии информированного добровольного согласия.

Клеточные культуры и условия их культивирования. В исследовании использовали лейкоциты периферической крови и эксфолиативные буккальные клетки, а также клеточные линии THP-1 (острый моноцитарный лейкоз человека), KCL-22 и K-562 (хронический миелоидный лейкоз человека), HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) и MRC-5 (нормальные фибробласты лёгкого человека). Периферическую кровь и клетки линий THP-1, KCL-22 и K-562 культивировали в питательной среде RPMI-1640 (Gibco), а клетки HeLa и MRC-5 — в среде DMEM (Sigma Aldrich). Питательные среды содержали 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и 1 % раствора пенициллина/стрептомицина (Santa Cruz Biotechnology). Для индукции метафаз в культуру периферической крови добавляли фитогемагглютинин (10 мкг/мл).

Облучение периферической крови и клеток K-562 пучками электронов на линейном ускорителе AREAL. Периферическую кровь здоровых людей (двух доноров мужского пола и двух доноров женского пола) и клетки K-562 облучали пучками ускоренных электронов на линейном ускорителе AREAL (CANDLE, Институт Синхротронных Исследований, Армения). Условия и дозы для облучения были выбраны на основе литературных данных о генотоксических эффектах ускоренных электронов в клеточной линии лейкоза K-562 (Babayan et al., 2017). Кровь или клетки K-562 облучали дозами 0.5, 1.5 и 3.0 Гр с мощностью дозы 2 Гр/мин, зарядом пучка 10 пКл при энергии электронов 3 МэВ, длительностью импульса 0.42 фс и частотой импульсов 2 Гц.

Обработка крови и клеточных линий DOX и MMC. Для оценки цитотоксических эффектов DOX и MMC клетки MRC-5 и HeLa обрабатывали DOX (0.01–16 мкг/мл) или MMC (0.01–35 мкг/мл) в течение 24 ч при 37°C. Для индукции повреждений ДНК и хромосом, инсерций мтДНК в ядерный геном, а также мутаций и фрагментов внеклеточной мтДНК периферическую кровь здоровых доноров (двух мужчин и двух женщин) и клеточные линии обрабатывали DOX (0.0175, 0.025, 0.035, 0.05 и 0.07 мкг/мл) или MMC (0.01, 0.05 и 0.1 мкг/мл) в течение 24 или 72 ч. Концентрации DOX и MMC были выбраны на основе литературных данных (Chondrou et al., 2018) и собственных исследований.

Метод FISH для анализа инсерций мтДНК, CNV и теломер. Инсерции мтДНК анализировали в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах лейкоцитов человека стандартным методом FISH (Liehr et al., 1995). CNV анализировали в метафазных хромосомах лейкоцитов человека методом POD-FISH (Weise et al., 2008). CNV локусы (1p31.1, 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1) были выбраны на основании результатов геномного распределения CNV, индуцированных малыми дозами ионизирующего

излучения (Arlt et al., 2014). Длину теломер анализировали в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах лейкоцитов человека и интерфазных ядрах клеток К-562 методом Q-FISH (Barbaro et al., 2022). Для стандартного и POD-FISH методов применяли ДНК-зонд, а для Q-FISH – PNA (peptide-nucleic acid)-зонд.

Синтез ДНК-зондов для анализа CNV. Для получения ДНК-зондов использовались CNV-специфические ВАС клоны, которые амплифицировали с помощью ППР и метили флюорохромами с помощью нуклеотидной трансферазы (Roche, Карлсруэ, Германия) в Институте генетики человека (Йена, Германия). Для получения зондов были использованы следующие ВАС клоны: RP11-393 N21 (TexasRed), RP11-1129E22 (SpectrumGreen), RP11-174 K23 (TexasRed), RP11-123 L21 (SpectrumOrange) и RP11-264 M12 (SpectrumGreen) для 1p31.1, 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 хромосомных локусов, соответственно.

Регистрация изображений для анализа CNV и теломер. Анализ и регистрацию изображений CNV и теломерных сигналов проводили с применением автоматической системы Isis (MetaSystems). Для анализа CNV сигналов использовалась программа ImageJ (версия 1.46r) (Iourov, 2017; Narutyunyan et al., 2022) и измеряли размеры CNV на основе интенсивностей флуоресценции сигналов. Анализировали 50-60 метафаз для каждого участка хромосомы, а полученные данные выражали в условных единицах (у.е.). Пример анализа CNV в хромосомном локусе 16q23.1 представлен на рисунке 1.

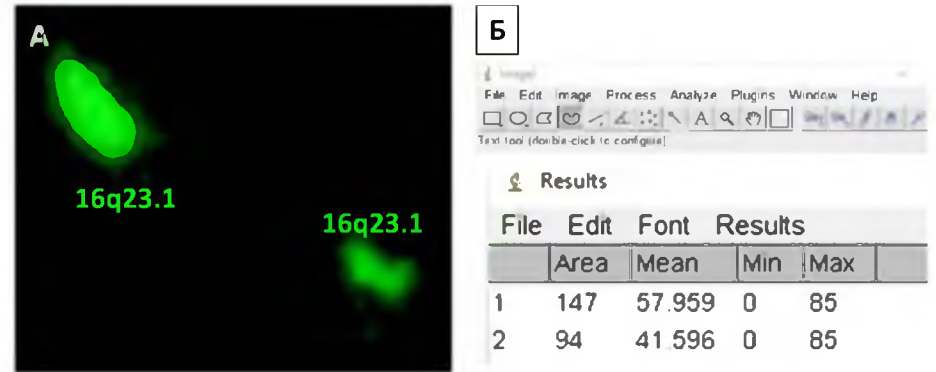


Рисунок 1. Пример анализа CNV сигналов в программе ImageJ. (А) Видны два сигнала CNV на гомологических хромосомах в локусе 16q23.1. (Б) В верхнем участке рисунка изображены инструменты для выбора CNV сигналов в программе ImageJ. В нижнем участке рисунка изображены полученные данные от каждого CNV сигнала.

Синтез ДНК-зондов для анализа инсерций мтДНК. Для анализа инсерций мтДНК в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах были использованы синтезированные нами ДНК-зонды комплементарные к мтДНК. 5'-ТАААСТААТАСАСАГТСТТГТАААСС-3' и 5'-ТТГАГГАГГТААГСТАСАТАА-3' праймеры использовали для амплификации мтДНК из вектора pGEM. Мечение проводили с использованием девяти пар праймеров, специфичных для мтДНК (Ramos et al., 2009).

Для установления позитивного контроля полученные зонды гибридизовали с метафазными хромосомами здорового человека с подтвержденной инсерцией мтДНК в 14q31 хромосомном локусе. ВАС зонд (AB042240) из ДНК хлоропластов пшеницы использовали для установления негативного контроля. В каждом экспериментальном варианте анализировали по 450 метафазных пластинок и 500 интерфазных ядер.

Для анализа теломерных сигналов использовался бесплатный плагин “Telometer” (версия 3.0.6) для программы ImageJ. Анализировали 30-40 метафазных пластинок или интерфазных ядер от каждого донора (в трёх повторностях). В клетках линии K-562 для каждой дозы облучения и в контроле было проанализировано 120-160 интерфаз в четырёх повторностях.

Нокадаун гена *H1-5* методом редактирования генома CRISPR-Cas9 и селекция клеток.

Для нокадауна гена *H1-5* использовали двуниказную пару плазмид Histone H1 Double Nickase Plasmid CRISPR-Cas9 KO (H1.5-Cas9-GFP, Santa Cruz Biotechnology). Одна из плазмид H1.5-Cas9-GFP содержит ген зелёного флуоресцентного белка (GFP), а другая — ген устойчивости к пуromидину. Основные структурные элементы плазмиды H1.5-Cas9-GFP представлены на рисунке 2. Плазмида также кодирует специфичную для гена *H1-5* направляющую РНК (sgRNA) и нуклеазу Cas9. Клетки MRC-5 и HeLa высевали в 6-луночные планшеты в концентрации 2×10^5 клеток на лунку в питательной среде DMEM. Трансфекцию проводили с использованием трансфекционной среды и трансфекционного реагента (аналог липофектамина). Эксперименты выполняли в трёх повторностях. Клетки, не подвергавшиеся трансфекции плазмидными конструкциями, использовали в качестве клеток дикого типа. Селекцию трансфицированных клеток проводили с использованием пуromидина (2 мкг/мл; Santa Cruz Biotechnology) в течение 72 ч. После селекции клетки культивировали в течение 5–7 дней в свежей среде DMEM, дополненной FBS.

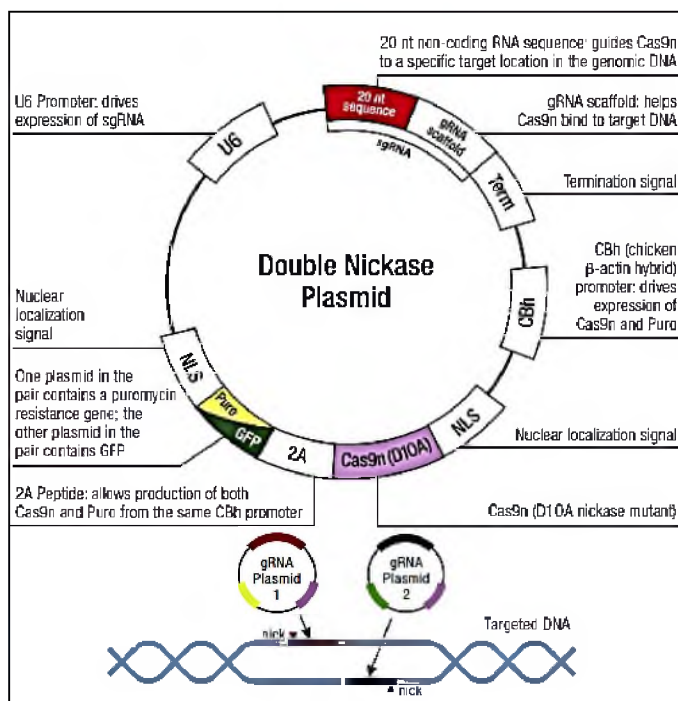


Рисунок 2. Основные структурные элементы плазмиды H1.5-Cas9-GFP для нокаута гена *H1-5* в клетках человека (<https://www.scbt.com/browse/crispr-knockout-activation-products>).

Щелочная версия метода ДНК-комет. Для оценки повреждений ДНК применяли щелочную версию метода ДНК-комет (Collins, 2004). Смесь клеток с легкоплавкой

агарозой наносили на предметные стекла, предварительно покрытые 1 % агарозой (NMA; Carl Roth), и лизировали в течение 1 ч при 4°C. ДНК денатурировали в щелочном буфере в течение 20 мин при 4°C, после чего проводили электрофорез при 1 В/см (25 В, 300 мА) в течение 20 мин при 4°C. После нейтрализации (0.4 М Tris, pH 7.5) препараты окрашивали бромистым этидием (20 мкг/мл). Изображения ДНК-комет анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss, оснащённого CCD-видеокамерой. Измерения выполняли с помощью программы Comet Assay IV (Perceptive Instruments). В качестве показателя уровня повреждений ДНК использовали % ДНК в хвосте кометы (Azqueta et al., 2020). Для каждого варианта обработки анализировали по 150 клеток (по 50 клеток на каждом слайде).

Микроядерный тест. Микроядерный тест с блокированием цитокинеза в лимфоцитах периферической крови человека и клеточных линиях MRC-5 и HeLa проводили согласно Chondrou et al. (2018). Через 44 ч в культуру крови добавляли DOX (0.025, 0.035 и 0.05 мкг/мл), а через 48 ч — цитохалазин В (3 мкг/мл). Концентрации DOX были выбраны на основе литературных данных (Chondrou et al., 2018) и собственных исследований. После гипотонической обработки и фиксации препараты окрашивали 10 % раствором Гимзы.

Оценка жизнеспособности клеток. Число жизнеспособных клеток THP-1, KCL-22 и K-562 оценивали методом исключения трипанового синего (Strober, 2015). Количество живых (неокрашенных) и мёртвых (окрашенных) клеток подсчитывали с использованием камеры Горяева. Жизнеспособность клеток MRC-5 и HeLa определяли методом МТТ-окрашивания (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) (Kumar et al., 2018). Клетки высевали в 96-луночные планшеты и через 24 ч обрабатывали DOX (0.0175–1.74 мкг/мл) или MMC (0.01–20 мкг/мл) в течение 24 ч. Затем в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. После удаления среды кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида. Оптическую плотность измеряли при 570 нм с использованием

Анализ мутаций мтДНК и экспрессии гена *HL-5* методом ПЦР. ДНК и РНК из клеток периферической крови и клеточных линий выделяли с использованием наборов DNeasy Mini Kit и RNeasy Mini Kit (Qiagen), соответственно. ДНК применяли для анализа мутаций и фрагментов внеклеточной мтДНК методом ПЦР, а РНК — для анализа экспрессии гена *HL-5* методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR) в клетках HeLa и MRC-5 (Medrzycki et al., 2012). Синтез кДНК проводили с использованием набора Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, США). RT-qPCR выполняли с использованием праймеров для *GAPDH* (F: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'; R: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3') и *HL-5* (F: 5'-AGAGCCCTAAGAAGGCCAAG-3'; R: 5'-CACGCCAGCTTCTCTACTTCT-3').

Статистический анализ. Статистический анализ данных осуществляли с помощью программы Statgraphics Centurion 16.2 (StatPoint Technologies, Inc., США) с применением t-теста, непараметрического теста Манна-Уитни, теста Колмогорова-Смирнова, теста множественных сравнений (Multiple Range Test), критерия Крускала-Уоллиса, рангового корреляционного анализа Спирмена и корреляционного анализа Пирсона. Отношение шансов (Odds Ratio) и пороговые значения рабочей характеристики приёмника (Receiver Operating Characteristic, ROC) анализировали с помощью онлайн статистических программ MedCalc (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php) и Epitools (<https://epitools.ausvet.com.au/rocurves>), соответственно. SRplot был применен для построения кривой рабочей характеристики приёмника (<http://www.bioinformatics.com.cn/en/keywords=roc>). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Оценка молекулярно-цитогенетических эффектов облучения ускоренными электронами AREAL на CNV методом POD-FISH in vitro

3.1.1. Анализ CNV в метафазах лейкоцитов крови после облучения ускоренными электронами

Облучение лимфоцитов дозами 0.5, 1.5 и 3.0 Гр значительно увеличивало интенсивность ВАС-сигналов в локусах 1p31.1, 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 по сравнению с контролем вследствие индуцированных дупликаций или амплификаций (рисунок 3). После облучения дозой 3.0 Гр интенсивность сигналов в локусах 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 была достоверно выше, чем в 1p31.1, что указывает на меньшую чувствительность этого локуса к облучению ускоренными электронами.

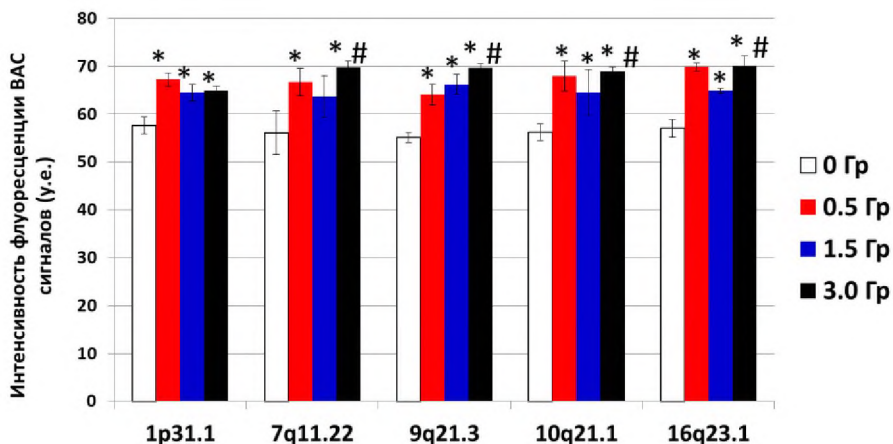


Рисунок 3. Уровни флуоресценции ВАС сигналов (среднее $\pm$ стандартное отклонение, условные единицы) в хромосомных локусах 1p31.1, 7q11.22, 9q21.3, 10q21.1 и 16q23.1 лимфоцитов после облучения ускоренными электронами. * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контрольными клетками (0 Гр) (t-критерий Стьюдента); # $p < 0.05$ – достоверное увеличение сигнала по сравнению с локусом 1p31.1 после облучения дозой 3.0 Гр (t-критерий Стьюдента). у.е. – условные единицы.

3.1.2. Корреляция ВАС сигналов CNV с дозами облучения, длиной хромосом, плотностью генов и положением хромосом в интерфазном ядре

Выявлена достоверная положительная корреляция между всеми хромосомными локусами и дозами облучения, за исключением локуса 1p31.1 ($p > 0.05$). Таким образом, генетическая нестабильность исследованных CNV-локусов в различной степени коррелирует с дозами облучения ускоренных электронов, что указывает на возможные различия в их чувствительности.

Для оценки потенциальной связи нестабильности CNV с характеристиками хромосом были проанализированы корреляции Пирсона (r) между интенсивностью флуоресценции ВАС-сигналов исследуемых локусов после облучения дозами 0.5, 1.5 и 3.0 Гр и локализацией хромосом в интерфазном ядре (Manvelyan et al., 2008), длиной хромосом (Мб) и плотностью генов (ген/Мб) (Scherer, 2010).

Обнаружена достоверная отрицательная корреляция между интенсивностью флуоресценции и плотностью генов ($r = -0.475$, $p < 0.05$) в клетках, облучённых дозой 0.5 Гр, а также между интенсивностью флуоресценции и длиной хромосом ($r = -0.783$, $p < 0.001$) в клетках, облучённых дозой 3.0 Гр.

3.1.3. Анализ распределения клеток по уровню CNV

Поскольку наибольший уровень корреляции ВАС-сигналов с дозами облучения был выявлен в локусе **9q21.3** ($r = 0.847$), анализ распределения клеток по уровню CNV проводили именно для этого локуса. Спонтанный уровень CNV в нормальных лимфоцитах определяли с использованием ROC-анализа (Receiver Operating Characteristic), представляющего графический метод оценки бинарного классификатора и выбора дискриминационного порога на основе соотношения чувствительности и специфичности.

По результатам ROC-анализа был установлен пороговый уровень CNV 59.16 у.е., достоверно различающий контрольные и облучённые клетки и соответствующий 95-й перцентилу контрольной группы. Таким образом, в облучённых клетках амплификации CNV в локусе 9q21.3 определяли, как ВАС-сигналы с интенсивностью выше спонтанного уровня (>95-й перцентили контроля).

Было выявлено повышение частоты клеток с амплифицированными CNV во всех группах облучения. Тест Колмогорова-Смирнова выявил достоверные различия между распределениями клеток по интенсивности ВАС сигналов в локусе 9q21.3 в контрольных и облучённых образцах крови ($p < 0.05$) (рисунок 4). В вариантах облучения дозами 0.5, 1.5 и 3.0 Гр частота метафаз с амплифицированными CNV в локусе 9q21.3 составляла 75.87 %, 78.10 % и 88.88 %, соответственно.

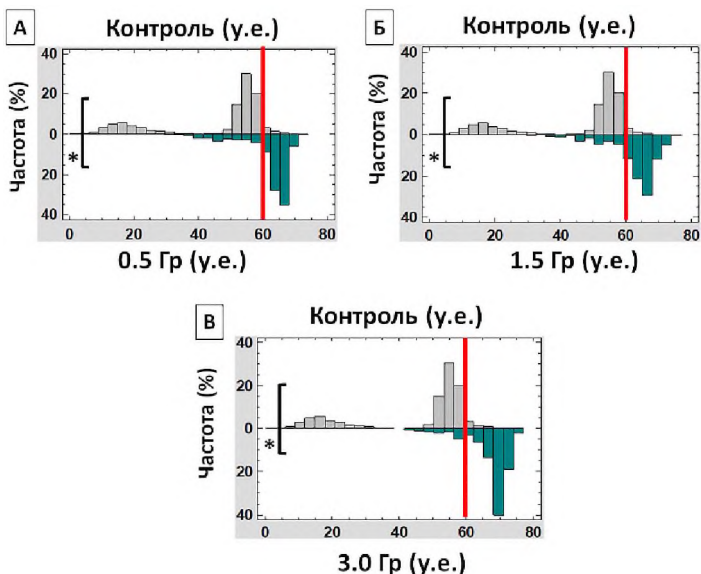


Рисунок 4. Частота метафаз по интенсивности ВАС сигналов в локусе 9q21.3 в метафазах лимфоцитов крови в контроле и в вариантах облучения дозами 0.5 (А), 1.5 (Б) и 3.0 Гр (В). Красный столбик – 95-й перцентиль контроля (59.16 у.е.). * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем (0 Гр) (тест Колмогорова-Смирнова). у.е. – условные единицы.

Таким образом, облучение ускоренными электронами повышает частоту клеток с амплифицированными CNV, при этом высокий уровень корреляции между дозами облучения и CNV в локусе **9q21.3** позволяет предположить неравномерную чувствительность различных CNV-локусов к радиационному воздействию.

Полученные данные подтверждают, что CNV-локусы, ранее выявленные как чувствительные к ионизирующему излучению (Arlt et al., 2014), также являются мишенями для ускоренных электронов. Учитывая, что *de novo* CNV могут возникать под действием ингибиторов репликации в фибробластах и лейкоцитах человека (Arlt et al., 2009; 2011; Narutyunyan et al., 2015), полученные результаты позволяют предположить возможное влияние ускоренных электронов на процессы репликации ДНК.

3.2. Оценка молекулярно-цитогенетических эффектов облучения ускоренными электронами AREAL на длину теломер методом Q-FISH *in vitro*

3.2.1. Анализ длины теломер в метафазах и интерфазных ядрах лейкоцитов крови и в интерфазных ядрах клеток линии К-562 после облучения ускоренными электронами

Было показано достоверное укорочение теломер в метафазах (рисунок 5А) и интерфазах (рисунок 5Б) лейкоцитов крови после облучения дозами 0,5, 1,5 и 3,0 Гр по сравнению с контролем (0 Гр) ($p < 0.05$).

Полученные данные свидетельствуют о сопоставимой эффективности метафазного и интерфазного Q-FISH для оценки генотоксического влияния ускоренных электронов на длину теломер в лейкоцитах человека (ДТЛ). Для анализа теломер в клетках К-562 был использован менее трудоемкий интерфазный Q-FISH. Показано достоверное укорочение теломер в интерфазах клеток К-562 после облучения дозами 0,5, 1,5 и 3,0 Гр по сравнению с контролем (0 Гр) ($p < 0.05$) (рисунок 5В). При этом теломеры клеток К-562 были короче, чем в лейкоцитах крови, как в контроле, так и после облучения.

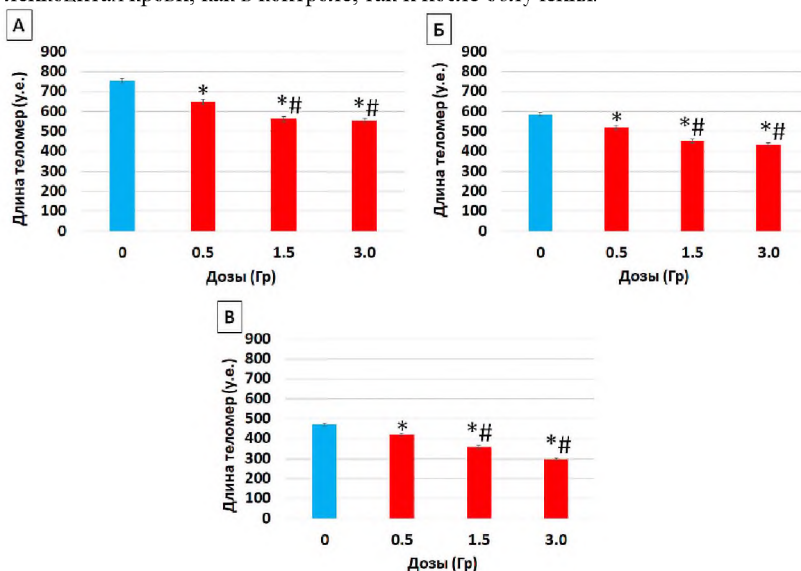


Рисунок 5. Анализ длины теломер (среднее $\pm$ стандартная ошибка) в (А) метафазах и (Б) интерфазах лейкоцитов крови, и (В) клеток К-562 облученных ускоренными электронами. * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем (тест Манна-Уитни), # $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с вариантом облучения 0,5 Гр (тест Манна-Уитни). у.е. – условные единицы.

Обнаружена достоверная отрицательная корреляция между длиной теломер и дозами облучения в метафазах ($r = -0.852$; $p < 0.0001$) и интерфазах лейкоцитов ($r = -0.901$; $p < 0.001$), и интерфазах клеток K-562 ($r = -0.978$; $p < 0.0001$).

3.2.2. Влияние облучения ускоренными электронами на распределение клеток по длине теломер

Для определения частоты клеток с короткими теломерами были проанализированы распределения клеток по длине теломер в метафазах и интерфазах лейкоцитов и интерфазах клеток K-562. Короткие теломеры определялись как теломеры, длина которых была меньше 20-ой перцентиля контрольной группы (Tsatsakis et al., 2019). Было выявлено повышение частоты клеток с короткими теломерами во всех группах облучения. В вариантах облучения дозами 0.5, 1.5 и 3.0 Гр частота метафаз лейкоцитов с короткими теломерами составляла 47.50, 79.17 и 81.67 %, частота интерфаз 22.70, 55.97 и 63.41 %, а частота интерфаз клеток K-562 - 23.17, 55.50 и 79.88 %, соответственно ($p < 0.05$). Обнаружены достоверные различия между распределениями клеток по длине теломер в облученных и контрольных образцах крови и клетках K-562 (за исключением доз 1.5 и 3.0 Гр в метафазах и интерфазах лейкоцитов) ($p < 0.05$).

Для определения какой из вариантов теломерного анализа (метафазный или интерфазный) является более чувствительным подходом, был проведён анализ ROC кривых для дифференциации контрольных клеток от вариантов облучения с последующим сравнением ROC кривых с применением теста ДеЛонга. Полученные результаты показывают, что уровень чувствительности метафазного варианта анализа теломер выше по сравнению с интерфазным вариантом.

Таким образом, ускоренные электроны индуцируют укорочение теломер в нормальных лейкоцитах крови и лейкозных клетках линии K-562. Теломеры в метафазах были длиннее, чем в интерфазах как в контроле, так и после облучения, что обеспечивает более высокую чувствительность метафазного варианта Q-FISH. Более точный анализ в метафазах связан с лучшим распределением и визуализацией сигналов. Анализ распределения теломер показал увеличение числа клеток с самыми короткими теломерами после облучения клеток крови и K-562, наиболее выраженное при дозе 3.0 Гр. При этом метафазный Q-FISH выявлял более высокие уровни самых коротких теломер по сравнению с интерфазным вариантом.

3.3. Анализ доксорубин-индуцированных инсерций мтДНК в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах лейкоцитов методом FISH *in vitro*

3.3.1. Анализ мутагенных эффектов доксорубина в лимфоцитах цельной крови человека микроядерным тестом с блокированием цитокинеза

Предполагается, что индукция разрывов хромосом может способствовать транслокации мтДНК в ядерную ДНК. Ранее было показано, что доксорубин (DOX) индуцирует микроядра (МЯ) в лимфоцитах человека в основном за счет кластогенного эффекта (Chondrou et al., 2018).

Полученные результаты показывают, что обработка периферической крови человека DOX (0.025, 0.035 и 0.05 мкг/мл) в течение 24 ч достоверно повышает уровни МЯ в лимфоцитах в зависимости от дозы.

3.3.2. Тестирование специфичности синтезированных мтДНК зондов

На сегодняшний день коммерческие FISH зонды для мтДНК не разработаны. Поэтому нами был синтезирован FISH зонд для мтДНК человека с применением DOP-PCR. Специфичность зонда оценивали с использованием метафазных хромосом лимфоцитов человека с ранее подтвержденной инсерцией мтДНК (Lutz-Bonengel et al., 2021) в 14q31 хромосомном локусе (позитивный контроль). Полученные результаты показывают, что синтезированный нами зонд специфически гибридизируется с мтДНК на хромосоме 14 (рисунок 6А).

3.3.3. Анализ инсерций мтДНК метафазных хромосомах лейкоцитов человека

Обработка периферической крови человека DOX (0.025, 0.035 и 0.05 мкг/мл) в течение 24 ч повышает частоту метафаз с инсерциями мтДНК в хромосомах лимфоцитов (рисунок 6Б и 6В). Этот эффект был особенно выражен при концентрациях DOX 0.025 (1.16 ± 0.23 %) и 0.035 мкг/мл (1.00 ± 0.15 %) ($p < 0.05$).

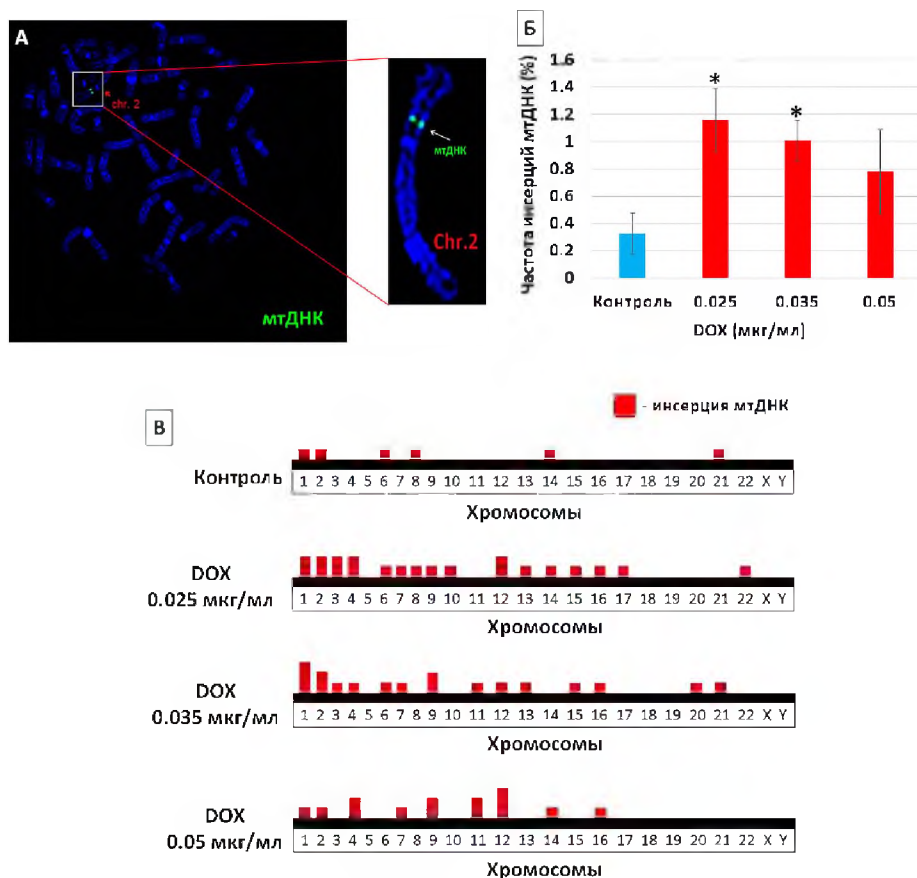


Рисунок 6. (А) Пример индуцированной инсерции мтДНК в хромосоме 2 после обработки клеток периферической крови DOX дозой 0.025 мкг/мл в течение 24 ч. (Б) Средние уровни ($\pm$ стандартное отклонение) инсерций мтДНК в хромосомах лимфоцитов периферической крови человека, обработанных DOX в течение 24 ч. (В) Распределение спонтанных и DOX-

индуцированных инсерций мтДНК в метафазных хромосомах человека. Каждый красный квадратный блок соответствует одной инсерции. * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента).

Поскольку ранее было показано, что спонтанный уровень фрагментов мтДНК (NUMT) в каждой хромосоме коррелирует с её длиной (Simone et al., 2011), нами был проведён анализ корреляции между хромосомным распределением DOX-индуцированных инсерций мтДНК и длиной хромосом. Также был выполнен корреляционный анализ взаимосвязи между DOX-индуцированными инсерциями мтДНК, числом NUMT на хромосому в референсном геноме человека (Simone et al., 2011), плотностью генов (Scherer, 2010) и уровнями DOX-индуцированных МЯ.

Полученные результаты выявили достоверную положительную корреляцию между числом инсерций мтДНК индуцированных DOX в концентрациях 0.025 и 0.035 мкг/мл, и длиной хромосом ($r = 0.631$ и $r = 0.502$, соответственно) и количеством NUMT на хромосому ($r = 0.667$ и $r = 0.509$, соответственно). Была показана достоверная корреляция между инсерциями мтДНК и уровнями DOX-индуцированных МЯ в концентрациях 0.025 и 0.05 мкг/мл ($r = 0.985$ и $r = 0.956$, соответственно).

Таким образом, впервые нами было выявлено, что DOX способен индуцировать инсерции мтДНК в хромосомах лейкоцитов человека. Поскольку DOX главным образом индуцирует кластогенные эффекты, наши результаты указывают на связь между инсерциями мтДНК и разрывами хромосом или двунитевыми повреждениями ДНК. Нами было показано, что DOX-индуцированные инсерции мтДНК положительно коррелируют с длиной хромосом и количеством NUMT на хромосому. Эти данные позволяют предположить о случайном распределении *de novo* мтДНК инсерций.

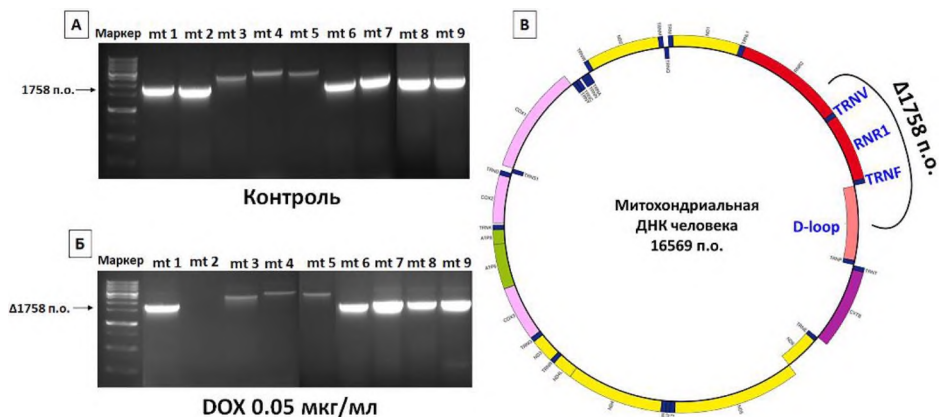
3.4. Анализ повреждений мтДНК в нормальных лейкоцитах и клеточных линиях человека методом ПЦР *in vitro*

мтДНК подвержена различным типам повреждений из-за отсутствия гистонов и эффективных механизмов репарации, а также близкой расположенности к сайтам возникновения активных радикалов в митохондриях. Ранее было показано, что DOX повышает уровень активных форм кислорода, что приводит к открытию пор переходной проницаемости митохондрий и выбросу мтДНК в цитоплазму. Таким образом мы предположили о потенциальной роли мтДНК как сенсора генотоксического действия. Мы проверили эту гипотезу путем анализа DOX-индуцированных повреждений клеточной и внеклеточной мтДНК в нормальных и раковых клетках человека методом ПЦР.

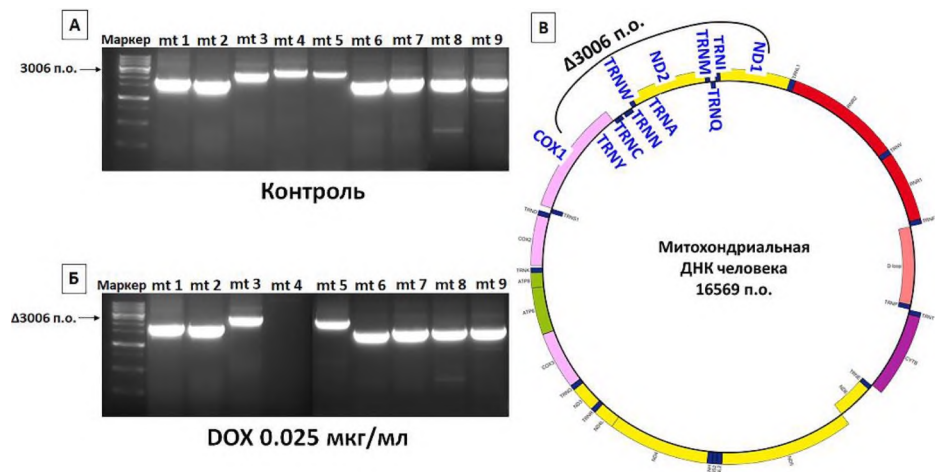
3.4.1. Анализ доксорубин-индуцированных повреждений мтДНК в лейкоцитах крови человека и клеточных линиях THP-1, KCL22 и K-562 методом ПЦР

Мутации мтДНК анализировали в лейкоцитах крови здорового человека и лейкозной клеточной линии THP-1 после обработки DOX (0.025, 0.035 и 0.05 мкг/мл) в течение 24 ч методом ПЦР. Для определения мутаций мтДНК применяли 9 пар праймеров для амплификации всего митогенома, которые не допускают ко-амплификацию ядерных мтДНК повторов (Ramos et al., 2011).

Гель-электрофорез ПЦР продуктов в контрольной группе клеток крови (рисунок 7А) и THP-1 (рисунок 8А) показал наличие всех ампликонов 9 пар праймеров мтДНК. В лейкоцитах периферической крови, обработанной DOX при концентрации 0.05 мкг/мл ПЦР анализ не обнаружил ампликон ($\Delta 1758$ п.о.) пары праймеров mt2 (рисунок 7Б). Согласно результатам BLAST-анализа, праймер mt2 амплифицирует фрагмент длиной 1758 пар оснований (п.о.), охватывающий участок митогенома от 16488 п.о. до 1677 п.о., и включает в себя примерно 659 п.о. D-петли, а также гены TRNF (тРНК-фенилаланин), RNR1 (12S рРНК), TRNV (тРНК-валин) и 8 п.о. гена RNR2 (16S рРНК) (рисунок 7В).



В лейкозных клетках линии ТНР-1 обработанных DOX при концентрации 0.025 мкг/мл ПЦР анализ не обнаружил ампликон ($\Delta 3006$ п.о.) пары праймеров mt4 (рисунок 8Б). Согласно результатам BLAST-анализа, праймер mt4 амплифицирует фрагмент длиной 3006 п.о., охватывающий участок митогенома от 3734-6739 п.о., и включает в себя примерно 528 п.о. гена ND1, а также гены TRN1 (тРНК-изолейтин), TRNQ (тРНК-глутамин), TRNM (тРНК-метионин), ND2, TRNW (тРНК-триптофан), TRNA (тРНК-аланин), TRNN (тРНК-аспарагин), TRNC (тРНК-цистеин), TRNY (тРНК-тирозин) и 706 п.о. гена COX1 (рисунок 8В).



человека. (А) В контрольных образцах наблюдаются ПЦР-продукты всех 9 пар праймеров мтДНК (mt1-9). (Б) Мутация во фрагменте мтДНК длиной 3006 п.о. ($\Delta 3006$ п.о.), не амплифицируемом праймерами mt4, выявлена в клетках, обработанных DOX (0.025 мкг/мл). (В) Предполагаемая локализация неамплифицированного участка $\Delta 3006$ п.о. показана на схеме митогенома человека. Маркер длины ДНК – 300-10000 п.о.

На основе полученных результатов мы проанализировали фрагменты внеклеточной мтДНК в лейкозных клеточных линиях KCL22 и K-562 после обработки DOX (0.025, 0.035 и 0.05 мкг/мл) в течение 24 ч методом ПЦР с применением 9 пар праймеров для амплификации всего митогенома (Ramos et al., 2011). Гель-электрофорез ПЦР продуктов внеклеточной ДНК изолированной из культуральной среды контрольной группы клеток KCL22 не выявил ампликонов 9 пар праймеров мтДНК. В клетках KCL22 после обработки DOX были выявлены следующие ампликоны внеклеточной мтДНК: при концентрации 0.025 мкг/мл – ~300 п.о. (праймеры mt9); при 0.035 мкг/мл – ~200 и ~1500 п.о. (mt9); при 0.05 мкг/мл – ~1500 п.о. (mt7), и ~1500 и ~500 п.о. (mt9). Фрагменты внеклеточной мтДНК в клеточной культуре K-562 не были обнаружены.

Таким образом, DOX индуцирует повреждения мтДНК и фрагменты внеклеточной мтДНК в нормальных клетках крови и линии лейкоза человека KCL22. При этом участки DOX-индуцированных мутаций и фрагменты внеклеточной мтДНК не перекрываются, что свидетельствует о случайном распределении индуцированных повреждений по митогеному.

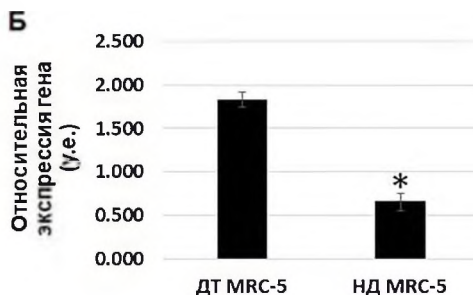
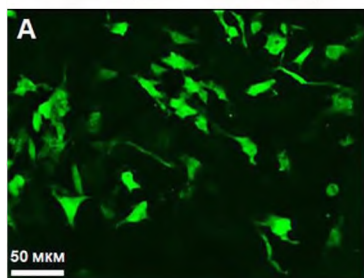
Информативность анализа внеклеточной мтДНК была показана у людей с интоксикацией канцерогенными пестицидами (Budnik et al., 2013), а также у астронавтов после полета в космос (Bisserier et al., 2021), в цитоплазме клеток и плазме крови облученных мышей (Shimura et al., 2025) и в облученных фибробластах человека (Ariyoshi et al., 2019). В целом, полученные нами результаты согласуются с данными литературы и показывают потенциальную значимость внеклеточной мтДНК в качестве биомаркера генотоксического действия в клетках человека.

3.5. Анализ геномной нестабильности в клетках MRC-5 и HeLa с нокдауном гена *HI-5* методом CRISPR-Cas9

3.5.1. Нокдаун гена *HI-5* в клетках MRC-5 и HeLa методом CRISPR-Cas9

Анализ экспрессии флуоресцентного белка GFP с помощью флуоресцентного микроскопа выявил успешную трансфекцию клеток MRC-5 (рисунок 9А) и HeLa (рисунок 9В) плазмидой H1.5-Cas9-GFP. После селекции резистентных к пуromицину клеток с нокдауном гена *HI-5*, был проведен ПЦР анализ с обратной транскрипцией в реальном времени. Было выявлено ~3-кратное снижение экспрессии гена *HI-5* в клетках MRC-5 (рисунок 9Б) и ~5-кратное снижение в клетках HeLa (рисунок 9Г).

MRC-5 (H1.5-Cas9-GFP)



HeLa (H1.5-Cas9-GFP)

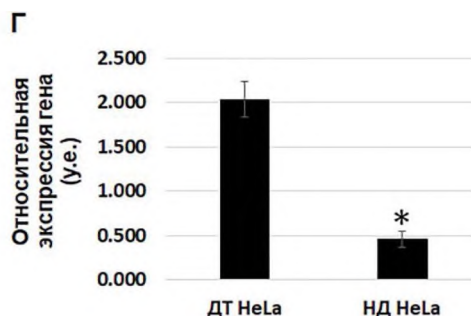
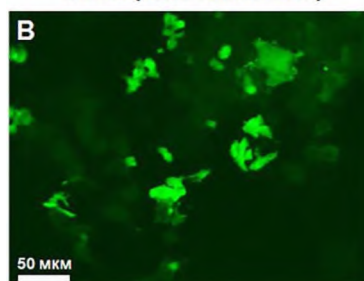


Рисунок 9. Анализ флуоресцентного белка GFP и экспрессии гена (среднее $\pm$ стандартное отклонение) *H1-5* в клетках MRC-5 и HeLa. Зеленое флуоресцентное свечение GFP в клетках (А) MRC-5 и (Б) HeLa после трансфекции плазмидой H1.5-Cas9-GFP. Уровень относительной экспрессии гена (y.e. – условные единицы) *H1-5* в клетках (Б) MRC-5 и (Г) HeLa. ДТ – клетки дикого типа, НД – клетки с нокдауном гена *H1-5*. * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с ДТ (t-критерий Стьюдента).

3.5.2. Анализ цитотоксических и генотоксических эффектов DOX и MMC в клетках MRC-5 и HeLa

Для выбора не цитотоксических концентраций DOX и MMC в клетках MRC-5 и HeLa анализировали уровни выживаемости клеток методом МТГ и исключением витального красителя трипанового синего. Анализ полученных результатов не выявил достоверной разницы между уровнями выживаемости клеток дикого типа и клеток с нокдауном гена *H1-5* при обработке DOX или MMC.

На основе этих результатов были выбраны оптимальные концентрации DOX и MMC для анализа генотоксических эффектов в клетках MRC-5 и HeLa методами МЯ анализа и ДНК-комет. Нокдаун гена *H1-5* достоверно повышал частоту МЯ в клетках MRC-5 и HeLa по сравнению с клетками дикого типа (рисунки 10А и 10Б). Обработка DOX повышала частоту МЯ в обоих типах клеток, при этом уровни DOX-индуцированных МЯ были достоверно выше в клетках с нокдауном *H1-5*. Схожие результаты были получены при обработке клеток MMC. Полученные результаты МЯ анализа были подтверждены методом ДНК-комет.

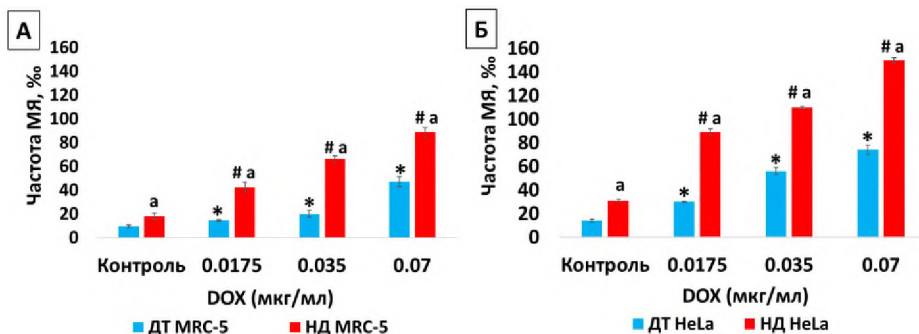


Рисунок 10. Анализ уровней МЯ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) индуцированные DOX в клетках MRC-5 (А) и HeLa (Б) дикого типа и с нокадаун гена *H1-5* методом МЯ теста. ДТ – клетки дикого типа, НД – клетки с нокадаун гена *H1-5*. * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем ДТ (t-критерий Стьюдента); # $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем НД (t-критерий Стьюдента); ^a $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с клетками ДТ (t-критерий Стьюдента).

Подавление экспрессии гена *H1-5* приводит к дестабилизации нуклеосом и повышенной доступности ДНК, что в свою очередь способствует увеличению уровня повреждений ДНК (Bosire et al., 2022). Saha et al. (2025) показали, что нокадаун *H1-5* приводит к нарушениям образования кинетохорного комплекса и формированию отстающих хромосом, которые в последствии приводят к образованию МЯ (Gomes et al., 2022). Таким образом, было выявлено, что снижение экспрессии гена *H1-5* способствует повышению уровней повреждений ДНК и хромосом в нормальных и опухолевых клетках человека.

3.6. Анализ геномной нестабильности в клетках крови пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19 *in vivo*

Для определения потенциальной значимости разработанных *in vitro* биомаркеров в системе *in vivo*, в качестве модели мы анализировали маркеры геномной нестабильности в клетках больных с COVID-19 в зависимости от тяжести заболевания, пола и возраста пациентов.

3.6.1. Демографические, клинические и лабораторные показатели пациентов с COVID-19

Шестьдесят пять госпитализированных пациентов с диагнозом COVID-19 (штамм Омикрон), были разделены на группы среднетяжелого и тяжелого течения заболевания. В группе со среднетяжелым течением COVID-19 женщины составили 52.8 %, мужчины - 47.2 %. В группе с тяжелым течением женщины составили 55.2 %, мужчины – 44.8%. Таким образом, половой состав двух групп значимо не различался. Статистически значимых различий в демографических и клинических характеристиках между мужчинами и женщинами выявлено не было, поэтому данные представлены в объединённых группах.

Была выявлена достоверная разница между индексом массы тела (body mass index, BMI) пациентов с COVID-19 и контрольной группой. Пациенты из группы с тяжелым течением COVID-19 были старше (медиана - 72 года) по сравнению с пациентами из группы со среднетяжелым течением (медиана - 62 года) ($p < 0.05$). Также были проанализированы ключевые биомаркеры COVID-19: гематологические показатели (лейкоциты (WBC), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), тромбоциты (PLT)), показатели воспаления (С-реактивный белок (CRP), прокальцитонин (PCT)),

свёртываемости крови (INR, APTT, фибриноген), а также биомаркеры повреждения органов-мишеней – почек (креатинин) и печени (ALT, AST) (таблица 1). Уровни CRP, PCT, INR и фибриногена превышали референсные значения у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением заболевания. В группе тяжёлого течения наблюдались лимфопения, повышение уровней CRP и креатинина, а также более продолжительные значения INR и срока госпитализации по сравнению с пациентами со среднетяжёлым течением ($p<0.05$).

Таблица 1. Лабораторные показатели и длительность пребывания в стационаре у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19

Лабораторные параметры	Референсные уровни	Среднетяжелая группа (медиана (IQR)), n= 30	Тяжелая группа (медиана (IQR)), n= 35
WBC, $\times 10^9/\text{л}$	3.50-10.00	6.18 (4.96-9.25)	9.04 (4.52-13.40)
NEU, $\times 10^9/\text{л}$	1.60-7.00	3.75 (2.83-5.68)	4.34 (2.43-9.94)
LYM, $\times 10^9/\text{л}$	1.00-3.00	1.37 (0.73-2.13)	0.88 (0.63-1.71)
PLT, $\times 10^9/\text{л}$	150-400	269.00 (221.00-339.00)	246.50 (217.00-328.00)
CRP, мг/л	<5	34.00 (7.20-85.00)	98.50 (61.00-181.00)*
PCT, нг/мл	<0.05	0.42 (0.32-0.46)	0.33 (0.21-0.45)
INR, с	0.85-1.2	1.34 (1.16-1.70)	1.75 (1.44-2.08)*
APTT, с	25-43	39.05 (36.00-42.00)	40.50 (33.50-47.50)
Фибриноген, мг/дл	200-400	500.00 (442.00-549.00)	500.00 (435.50-501.00)
Креатинин, мкм/л	53-115	48.00 (35.00-64.00)	63.50 (40.00-93.90)*
ALT, IU/л	0-38	23.50 (15.00-30.00)	25.00 (17.00-54.00)
AST, IU/л	0-41	21.55 (15.00-32.00)	22.00 (16.00-41.00)
LOS, дни	-	8.00 (7.00-10.00)	13.00 (6.00-20.00)*

* $p<0.05$ - достоверная разница по сравнению с пациентами со среднетяжёлым течением (тест Манна-Уитни); IQR - межквартильный размах; LOS - длительность пребывания в стационаре.

Как мужчины, так и женщины с COVID-19 были старше в группе с тяжёлым течением по сравнению с группой со среднетяжёлым течением. У мужчин с тяжёлым течением по сравнению с мужчинами со среднетяжёлым течением наблюдались более высокие значения BMI и CRP. У женщин с тяжёлым течением по сравнению с женщинами со среднетяжёлым течением были выше уровни INR и длительность пребывания в стационаре. Уровень прокальцитонина (показателя воспаления) у мужчин был выше, чем у женщин.

Мы разделили пациентов на две возрастные группы: взрослых (от 18 до 64 лет) и пожилых (65 лет и старше). В обеих группах с тяжёлым течением COVID-19 длительность пребывания в стационаре была дольше по сравнению со среднетяжёлой подгруппой. В группе пожилых пациентов с тяжёлым течением COVID-19 наблюдались более высокие уровни CRP, INR и фибриногена по сравнению с пациентами со среднетяжёлым течением.

3.6.2. Анализ уровней повреждений ДНК у пациентов с COVID-19 методами ДНК комет и ELISA

Достоверных различий в уровнях повреждений ДНК, выраженные в виде % ДНК в хвосте комет в лейкоцитах и уровнями 8-OHdG в плазме, между пациентами с COVID-19 с сопутствующими заболеваниями ($n=36$) и без них ($n=29$) не было выявлено. Поэтому данные по этим подгруппам анализировались совместно.

Уровни % ДНК в хвосте (рисунки 11А и 12А) и 8-OHdG (рисунки 11Б и 12Б) были выше в общей группе пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой независимо от пола. При этом % ДНК в хвосте в лейкоцитах был выше у пациентов мужского пола по сравнению с женщинами. Оба биомаркера также были выше при тяжёлом течении COVID-19 по сравнению со среднетяжёлым. В группе со среднетяжёлым

течением % ДНК в хвосте были выше у мужчин, тогда как уровни 8-OHdG в плазме женщин были выше при тяжёлом течении заболевания по сравнению со среднетяжёлым.

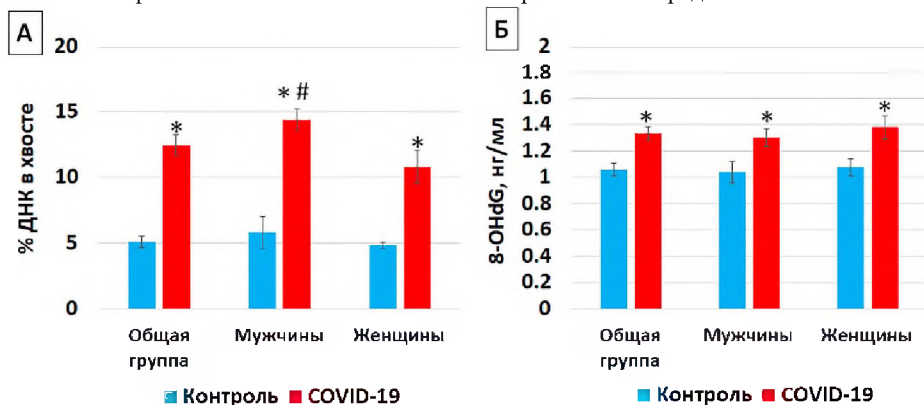


Рисунок 11. Анализ уровней повреждений ДНК (среднее $\pm$ стандартная ошибка) в (А) лейкоцитах (% ДНК в хвосте комет) и в (Б) плазме крови (8-OHdG) здоровых людей (контроль) и пациентов с COVID-19 в общей группе и разделенных по полу. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с контрольной группой (тест Манна-Уитни); # $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с пациентами женского пола (тест Манна-Уитни).

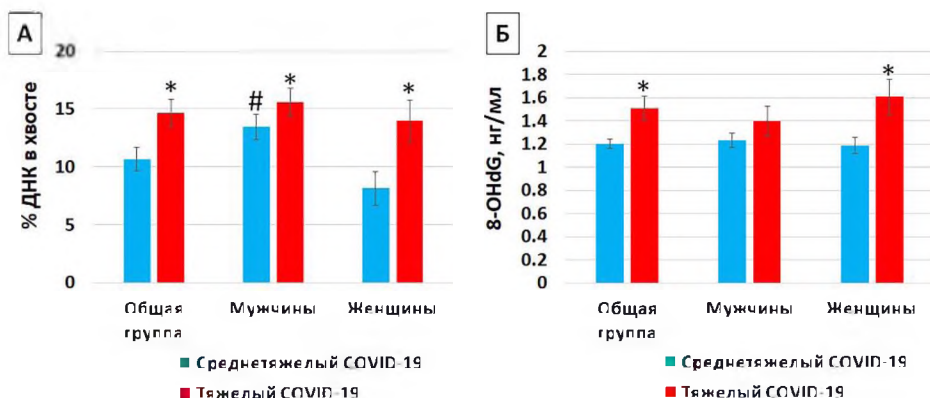


Рисунок 12. Анализ уровней повреждений ДНК (среднее $\pm$ стандартная ошибка) в (А) лейкоцитах (% ДНК в хвосте комет) и в (Б) плазме крови (8-OHdG) пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 в общей группе и разделенных по полу. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с группой со среднетяжелым течением COVID-19 (тест Манна-Уитни); # $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с пациентами женского пола со среднетяжелым течением COVID-19 (тест Манна-Уитни).

Поскольку возраст является известным фактором риска тяжелого течения COVID-19, были проанализированы уровни повреждений ДНК у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания, разделённых на две возрастные подгруппы: <65 лет и ≥ 65 лет. Уровни % ДНК в хвосте (рисунок 13А) у пациентов с тяжёлым течением в обеих возрастных подгруппах были выше по сравнению с пациентами со среднетяжёлым течением. Уровень 8-OHdG в плазме также был выше у пациентов ≥ 65 лет с тяжёлым

течением по сравнению с пациентами со среднетяжёлым течением заболевания (рисунок 13Б).

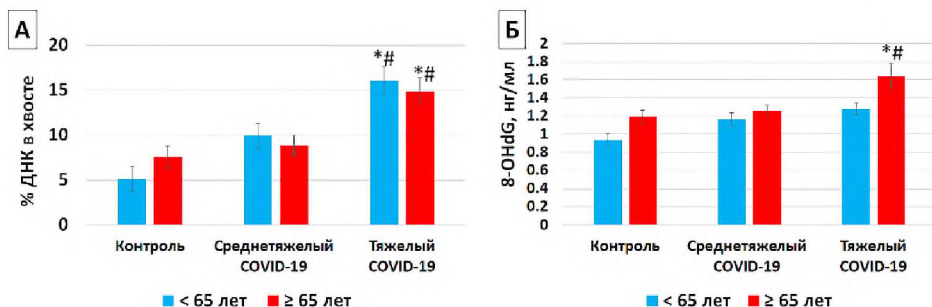


Рисунок 13. Анализ уровней повреждений ДНК (среднее $\pm$ стандартная ошибка) в (А) лейкоцитах (% ДНК в хвосте комет) и в (Б) плазме крови (8-OHdG) пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 разделенных на две возрастные подгруппы: взрослых (<65 лет) и пожилых людей (≥ 65 лет). * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с контрольной группой (тест Манна-Уитни); [#] $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с пациентами со среднетяжелым течением COVID-19 (тест Манна-Уитни).

3.6.3. Анализ длины теломер в интерфазных ядрах лейкоцитов крови и эксфолиативных буккальных клетках у пациентов с COVID-19 методом O-FISH

Достоверных различий по длине теломер лейкоцитов (ДТЛ) и длине теломер буккальных клеток (ДТБК), между пациентами с COVID-19 с сопутствующими заболеваниями ($n=36$) и без них ($n=29$) не было выявлено. Поэтому данные по этим подгруппам анализировались совместно.

ДТЛ (рисунки 14А и 15А) и ДТБК (рисунки 14Б и 15Б) были короче в общей группе пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой независимо от пола. При этом теломеры буккальных клеток были короче, чем теломеры лейкоцитов. ДТЛ и ДТБК также были короче при тяжёлом течении COVID-19 по сравнению со среднетяжёлым. После стратификации по полу достоверное укорочение сохранялось для ДТЛ, тогда как в буккальных клетках данный тренд не наблюдался.

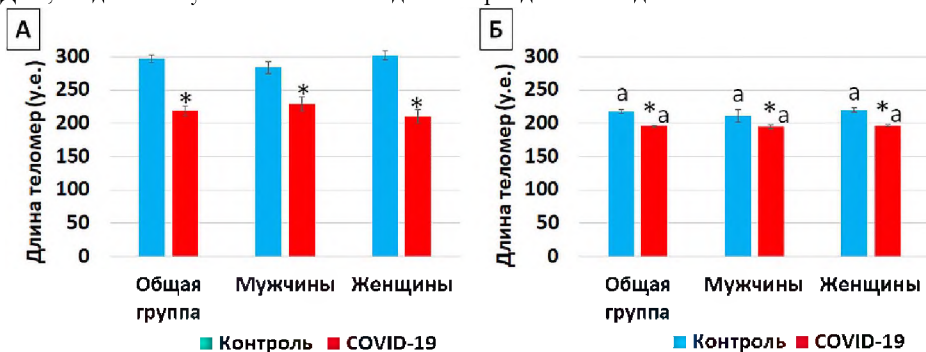


Рисунок 14. Анализ (А) ДТЛ и (Б) ДТБК (среднее $\pm$ стандартная ошибка) пациентов с COVID-19 в общей группе и разделенных по полу. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с контрольной группой (тест Манна-Уитни); ^a $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с лейкоцитами крови соответствующей группы (тест Манна-Уитни). у.е. – условные единицы.

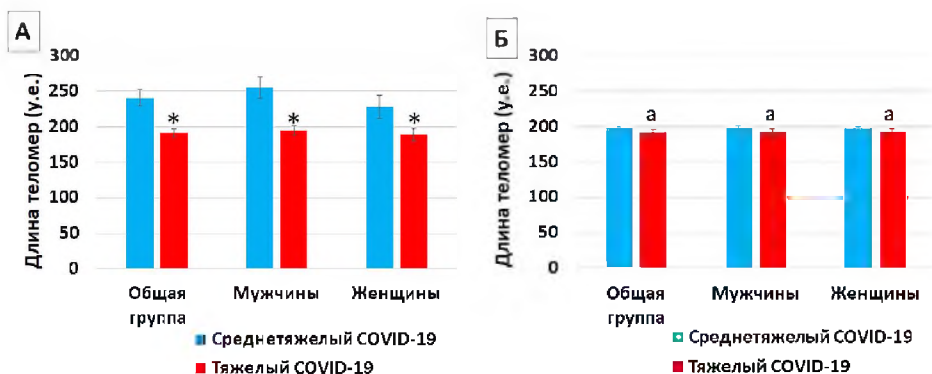


Рисунок 15. Анализ (А) ДТЛ и (Б) ДТБК (среднее $\pm$ стандартная ошибка) пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 в общей группе и разделенных по полу. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с группой со среднетяжелым течением COVID-19 (тест Манна-Уитни); ^a $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с лейкоцитами крови соответствующей группы (тест Манна-Уитни). у.е. – условные единицы.

ДТЛ (рисунок 16А) у тяжелобольных пациентов в обеих возрастных подгруппах (<65 лет и ≥ 65 лет) были короче по сравнению с подгруппами со среднетяжелым течением COVID-19.

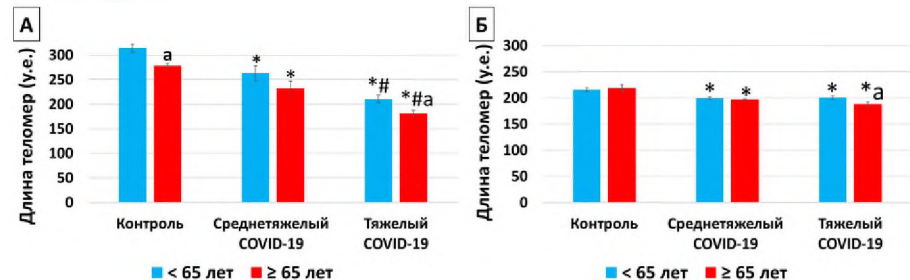


Рисунок 16. Анализ (А) ДТЛ и (Б) ДТБК (среднее $\pm$ стандартная ошибка) пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 в возрастных подгруппах <65 лет ≥ 65 лет. * $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с контролем (тест Манна-Уитни); [#] $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с пациентами со среднетяжелым течением COVID-19 (тест Манна-Уитни); ^a $p < 0.05$ - достоверная разница по сравнению с пациентами <65 лет; у.е. – условные единицы.

3.6.4. Оценка прогностической способности биомаркеров геномной нестабильности у пациентов с COVID-19

Для оценки значимости биомаркеров повреждений ДНК (% ДНК в хвосте, ДТЛ, ДТБК и 8-OHdG) для различения здоровых лиц и пациентов с COVID-19 (рисунок 17А), а также пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания (рисунки 17Б-17Е), был проведен АУС-анализ.

Установлены пороговые значения биомаркеров геномной нестабильности, позволяющие различать здоровых лиц и пациентов с COVID-19 (рисунок 17А). АУС-анализ показал, что % ДНК в хвосте дискриминирует пациентов со среднетяжелым и

тяжёлым течением COVID-19 в общей группе (рисунок 17Б), у женщин (рисунок 17Г) и у пациентов >65 лет (рисунок 17Е). ДТЛ обладает дискриминирующей способностью в общей группе (рисунок 17Б), у мужчин (рисунок 17В) и в возрастных подгруппах <65 и >65 лет (рисунки 17Д и 17Е). Уровни 8-ОНдГ в плазме позволяют различать пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением заболевания в общей группе (рисунок 17Б) и у женщин (рисунок 17Г).

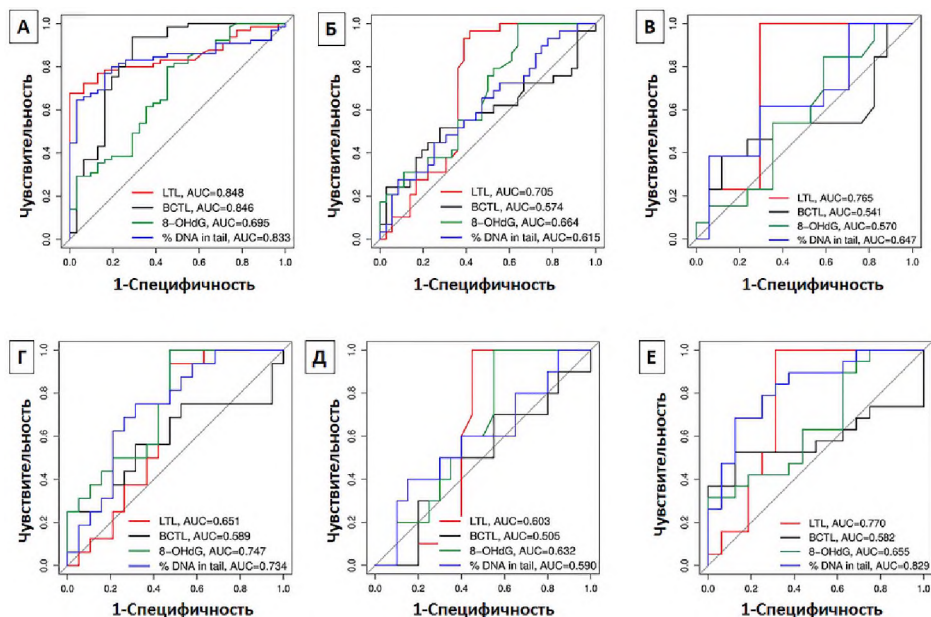


Рисунок 17. Анализ ROC-кривых % ДНК в хвосте, ДТЛ и ДТБК, и 8-ОНдГ в плазме для дискриминации (А) здоровых людей от пациентов с COVID-19 и (Б-Е) пациентов средней и тяжелой степени тяжести COVID-19 (Б) в общей группе, среди (В) мужчин, (Г) женщин, пациентов (Д) <65 и (Е) ≥65 лет, с соответствующими значениями AUC. LTL – длина теломер лейкоцитов; BCTL – длина теломер буккальных клеток; % DNA in tail – % ДНК в хвосте. Графики получены с помощью SRplot (Tang et al., 2023).

Для определения независимых предикторов тяжести COVID-19 был проведён многофакторный регрессионный анализ (таблица 2), в который были включены клинико-лабораторные показатели (BMI, CRP, креатинин и INR), ранее показавшие более высокие значения у пациентов с тяжёлым течением заболевания.

ДТЛ была обратно ассоциирована с тяжёлым течением COVID-19 в общей группе пациентов, у мужчин и в возрастных подгруппах <65 и ≥65 лет. % ДНК в хвосте был прямо ассоциирован с тяжестью заболевания у женщин. Корреляции с тяжестью COVID-19 были выявлены для CRP (в общей группе и ≥65 лет), креатинина (группе <65 лет) и возраста пациентов (в группе женщин).

Таблица 2. Многофакторный регрессионный анализ изученных клинико-лабораторных параметров и биомаркеров повреждения ДНК для прогнозирования тяжести COVID-19. В таблице представлены статистически достоверные факторы из всех изученных.

Группы пациентов	Отношение шансов (95 % CI)	Изменение шансов тяжелого COVID-19 при увеличении на 1 ед., %
Общая группа		
ДТЛ, у.е.	0.965 (0.942–0.989)	-3.5
CRP, мг/л	1.019 (1.004–1.035)	1.9
Мужчины		
ДТЛ, у.е.	0.969 (0.941–0.999)	-3.1
Женщины		
Возраст, лет	1.190 (1.017–1.392)	19.0
% ДНК в хвосте	1.185 (0.977–1.438)	18.5
<65 лет		
ДТЛ, у.е.	0.971 (0.936–1.007)	-2.9
Креатинин, мкм/л	1.058 (1.006–1.113)	5.8
>65 лет		
ДТЛ, у.е.	0.941 (0.892–0.993)	-5.9
CRP, мг/л	1.028 (0.996–1.061)	2.8

3.6.5. Оценка скорости укорочения длины теломер у пациентов с COVID-19

Поскольку достоверных пороговых значений ДТБК как независимого биомаркера тяжести заболевания не было выявлено, мы сравнили скорость укорочения теломер между контрольной группой и пациентами с COVID-19, используя пороговые значения ДТЛ.

Линейный регрессионный анализ выявил достоверную обратную корреляцию между возрастом и ДТЛ в контрольной группе ($r = -0.589$) и в общей группе пациентов с COVID-19 ($r = -0.561$) (рисунок 18А). Мы обнаружили более медленное укорочение теломер в общей группе пациентов с COVID-19 (0.44 у.е./год (длина теломер, у.е. = $211.72 - 0.44 \times \text{возраст}$)) по сравнению с контрольной группой (1.54 у.е./год (длина теломер, у.е. = $391.20 - 1.54 \times \text{возраст}$)) (рисунок 18А). Эта тенденция также наблюдалась при сравнении скорости укорочения длины теломер между группой женщин с COVID-19 (0.47 у.е./год (длина теломер, у.е. = $207.50 - 0.47 \times \text{возраст}$)) и контрольной группой (2.08 у.е./год (длина теломер, у.е. = $429.41 - 2.08 \times \text{возраст}$)) (рисунок 18Г). Аналогично, скорость укорочения длины теломер у пациентов с COVID-19 >65 лет (0.93 у.е./год (длина теломер, у.е. = $246.81 - 0.93 \times \text{возраст}$)) была значительно ниже по сравнению с контрольной группой (3.78 у.е./год (длина теломер, у.е. = $548.21 - 3.78 \times \text{возраст}$)) (рисунок 18Е). В контрольной группе была выявлена более низкая скорость укорочения теломер в возрастной подгруппе <65 лет (0.40 у.е./год (длина теломер, у.е. = $335.18 - 0.40 \times \text{возраст}$)) (рисунок 18Д) по сравнению с >65 лет (3.78 у.е./год).

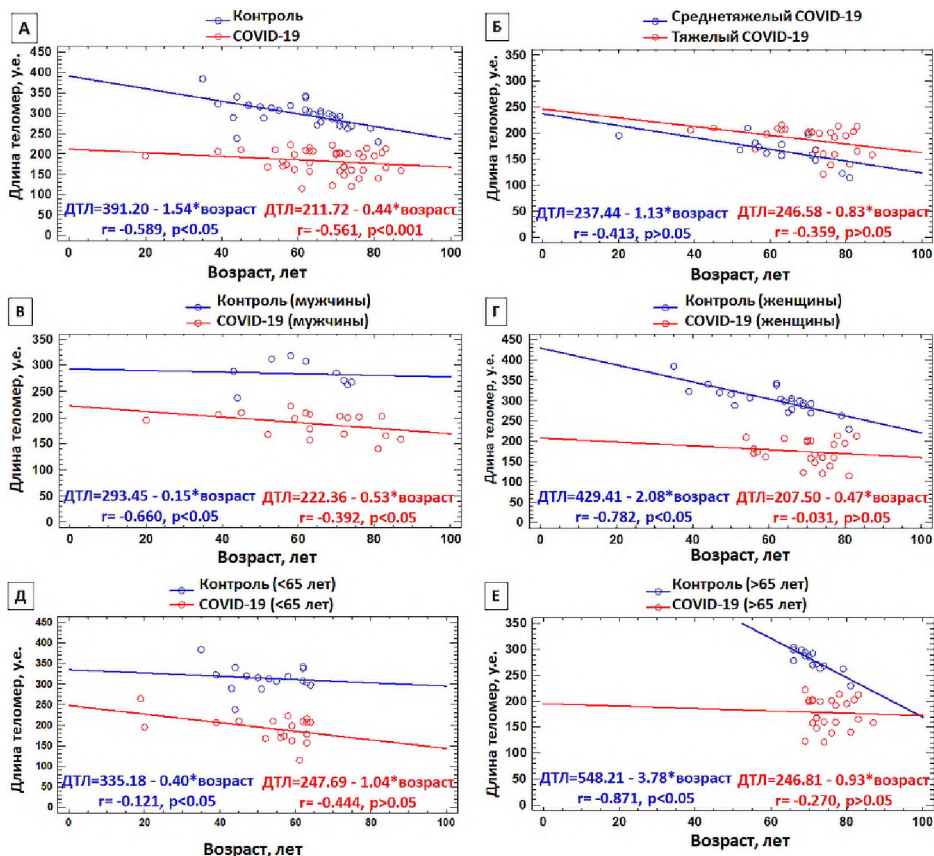


Рисунок 18. Линейный регрессионный анализ скорости укорочения ДТЛ у контрольной группы и пациентов с COVID-19. Указаны коэффициенты корреляции Пирсона и наклоны в год.

Также была проанализирована частота клеток с критически короткими теломерами, определённых как значения теломер ниже 20-го перцентиля контрольной группы.

На рисунке 19 представлены распределения клеток по длине теломер; красным столбиком отмечен 20-й перцентиль длины теломер контрольной группы. Тест Колмогорова-Смирнова выявил достоверные различия между распределениями теломер в контрольной группе и у пациентов с COVID-19, стратифицированных по тяжести заболевания (рисунок 19А и 19Б), полу (рисунок 19В и 19Г) и возрастным подгруппам (рисунок 19Д и 19Е). Таким образом, во всех исследованных группах пациентов с COVID-19 было выявлено увеличение доли клеток с критически короткими теломерами.

Точный тест Фишера подтвердил статистически достоверное увеличение доли клеток с критически короткими теломерами в общей группе пациентов с COVID-19 и во всех подгруппах, стратифицированных по тяжести заболевания, полу и возрасту ($p < 0.05$) (рисунок 20).

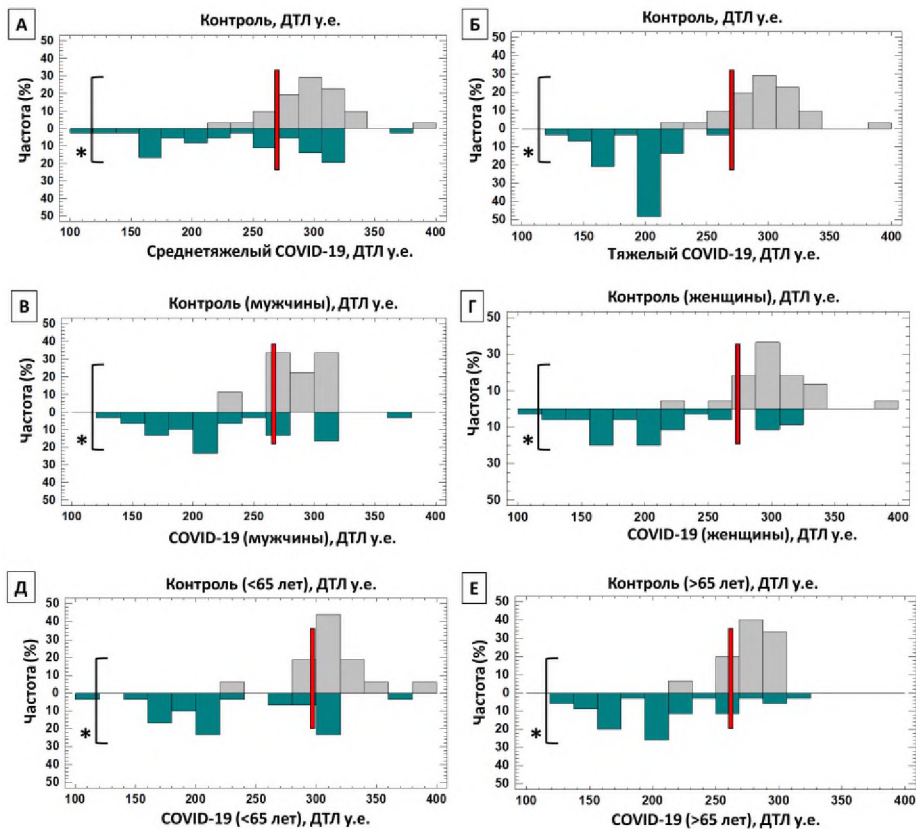


Рисунок 19. Анализ частоты интерфаз по ДТЛ пациентов с COVID-19, стратифицированных по тяжести заболевания, полу и возрастным подгруппам. Красный столбик – 20-й перцентиль контроля. * $p < 0.05$ – достоверная разница по сравнению с контролем (тест Колмогорова-Смирнова). у.е. – условные единицы.

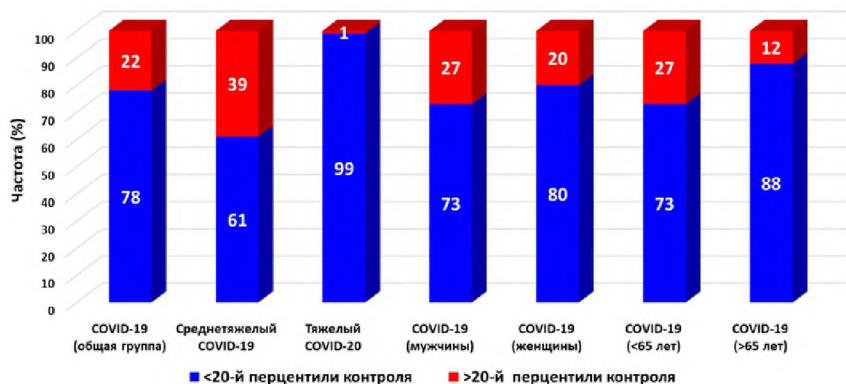


Рисунок 20. Частоты лейкоцитов (указаны на столбцах) с ДТЛ короче (синие столбцы) или длиннее (красные столбцы) 20-го перцентиля контрольной группы у здоровых лиц и в группах пациентов с COVID-19 стратифицированных по тяжести заболевания, полу и возрасту (точный тест Фишера).

Также была проанализирована корреляция между уровнем 8-OHdG в плазме и ДТЛ у пациентов с COVID-19 как независимого от возраста фактора, способного способствовать укорочению теломер. Корреляционный анализ выявил статистически значимую отрицательную связь между уровнями 8-OHdG и ДТЛ у пациентов, стратифицированных по тяжести заболевания (рисунок 21А), полу (рисунок 21Б) и возрасту (рисунок 21В), что указывает на возможную роль оксидативного стресса в укорочении теломер.

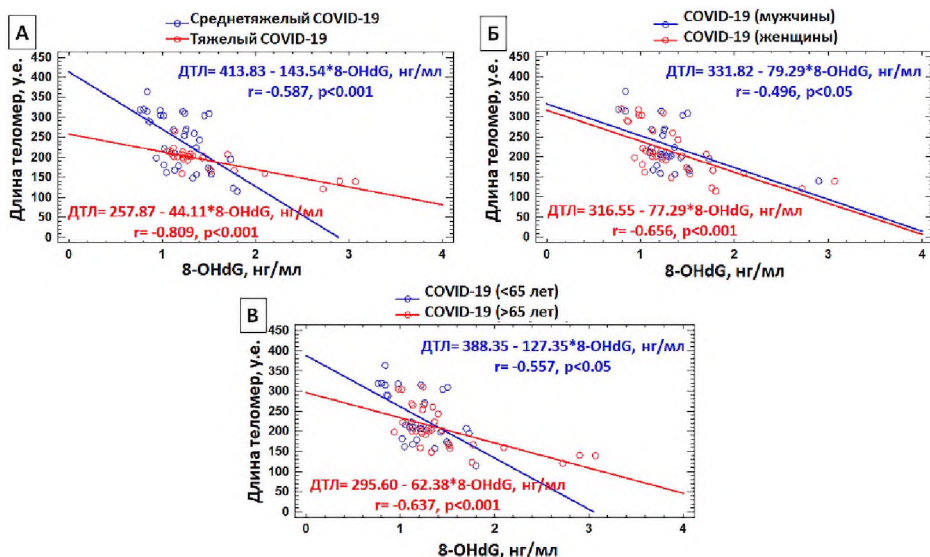


Рисунок 21. Корреляции Спирмена (r) между ДТЛ и уровнем 8-OHdG в плазме у пациентов с COVID-19, стратифицированных по тяжести заболевания, полу и возрасту.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о формировании при COVID-19 интегрального фенотипа геномной нестабильности, выраженность которого возрастает при тяжелом течении заболевания. Повышение % ДНК в хвосте, увеличение уровня 8-OHdG в плазме и укорочение ДТЛ и ДТБК были более выражены при тяжелом течении COVID-19 по сравнению со среднетяжелым. При стратификации по полу и возрасту статистически значимая ассоциация с тяжестью заболевания наиболее устойчиво сохранялась для ДТЛ.

У мужчин при среднетяжелом течении регистрировались более высокие значения % ДНК в хвосте по сравнению с женщинами, тогда как у женщин при тяжелом течении отмечалось более выраженное повышение уровня 8-OHdG, что отражает различия в характере генотоксического и оксидативного ответа. В возрастной подгруппе ≥ 65 лет при тяжелом течении выявлялись более высокие уровни 8-OHdG и более выраженное укорочение длины теломер лейкоцитов, что согласуется с возраст-ассоциированным снижением эффективности поддержания геномной стабильности. Выявленная отрицательная корреляция между 8-OHdG и длиной теломер подтверждает сопряженность

окислительного стресса с теломерной дисфункцией. Увеличение доли клеток с критически короткими теломерами отражает сдвиг распределения длины теломер в сторону критически коротких значений при прогрессировании заболевания.

ROC- и многофакторный регрессионный анализы продемонстрировали диагностическую и прогностическую значимость длины теломер лейкоцитов как независимого маркера тяжести COVID-19. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что окислительное повреждение ДНК, накопление разрывов и укорочение теломер формируют совокупность взаимосвязанных проявлений геномной нестабильности при системной вирусной инфекции, отражающих сопряжённость генотоксических эффектов с клиническими характеристиками тяжести заболевания и создающих предпосылки для разработки трансляционных подходов к использованию биомаркеров геномной нестабильности в клинической оценке тяжести заболевания.

В целом, исследование позволило сформировать концепцию и методологию комплексной оценки маркеров геномной нестабильности в клетках человека, показать их информативность при действии генотоксических факторов и их ассоциацию с тяжестью COVID-19, что создаёт предпосылки для разработки трансляционных подходов к использованию данных маркеров в клинической стратификации тяжести заболеваний, сопровождающихся системным воспалением.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование по разработке и применению системы биомаркеров геномной нестабильности, индуцированной физическими и химическими факторами в клетках человека *in vitro*, и методологических подходов к оценке их клинической значимости *in vivo* позволяет сделать следующие выводы:

1. Разработанная система молекулярно-цитогенетической оценки генотоксических эффектов облучения ускоренными электронами позволила впервые выявить распределение интерстициальных и терминальных повреждений хромосом на основе анализа вариации количества копий ДНК (CNV) и длины теломер, соответственно.
2. Выявление радиационно-чувствительных хромосомных локусов CNV, различия в вариации частоты критически коротких теломер между нормальными и раковыми клетками человека, их пороговые значения и уровни чувствительности и специфичности позволяют рекомендовать молекулярно-цитогенетический анализ CNV и теломер в качестве биомаркеров генотоксического действия ионизирующего облучения.
3. Разработан молекулярно-генетический метод синтеза ДНК-зондов для флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), что позволило впервые выявить *de novo* инсерции мтДНК в хромосомах человека, индуцированные противоопухолевым препаратом доксорубицином. Предложенный молекулярно-цитогенетический подход позволяет анализировать хромосомные распределения индуцированных инсерций мтДНК и их ассоциацию с уровнями повреждений хромосом.
4. Выявлена роль клеточной и внеклеточной мтДНК при оценке генотоксического действия химических мутагенов в клетках человека. Показано, что в данных

условиях участки индуцированных мутаций и фрагменты внеклеточной мтДНК не перекрываются, что свидетельствует о случайном распределении этих повреждений по митогеному.

5. Впервые в Армении был внедрен метод CRISPR-Cas9, что позволило оценить роль гена линкерного гистона *H1-5* для спонтанной и индуцированной нестабильности генома в нормальных и раковых клетках человека.
6. Использование комплекса биомаркеров (ДНК-комет, длины теломер лейкоцитов и буккальных клеток и уровня 8-OHdG) позволило впервые идентифицировать характер генотоксических изменений при COVID-19, установить их связь с тяжестью заболевания в стратифицированных по полу и возрасту группах и подтвердить пригодность данного подхода для анализа генотоксических эффектов *in vivo*.
7. Использование указанного комплекса биомаркеров позволило впервые идентифицировать взаимосвязанные генотоксические эффекты при COVID-19 и установить их ассоциацию с тяжестью заболевания с учётом пола и возраста.
8. Выявлены пороговые значения изученных биомаркеров геномной нестабильности и их связь с клиническими и лабораторными критериями. Разработаны стандартные подходы к статистическому анализу результатов геномной нестабильности.
9. На основе проведенной работы разработаны комплексные биомаркеры геномной нестабильности на нуклеотидном, ДНК и хромосомном уровнях организации генома, применимые в моделях *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Տիգրան Հարությունյան:** Մոլեկուլային գենաթուխարանություն, Մենագրություն, Երևան: ԵՊՀ հրատ., 2026, 412 էջ:
2. **Harutyunyan T.**, Al-Rikabi A, Sargsyan A, Aroutiounian R, Hovhannisyan G. Mitochondrial DNA (MtDNA) detection by FISH. In: Liehr T, editor. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). Springer Protocols Handbooks. New York (NY): Humana; 2026, 587–595.
3. **Harutyunyan T.**, Sargsyan A, Tadevosyan G, Kalashyan L, Aroutiounian R, Hovhannisyan G. Knockdown of histone H1–5 gene affects the sensitivity of MRC-5 and HeLa cells to DNA damaging agents. *Hum Gene*. 2025;46:201475.
4. **T. Harutyunyan.**, A. Sargsyan, G. Tadevosyan, L. Kalashyan, R. Aroutiounian, G. Hovhannisyan. Micronuclei levels in doxorubicin- and mitomycin C-treated MRC-5 and HeLa cells with knockdown of the histone H1-5 gene. CRISPR-2025. 3rd International Congress. October 5–10, 2025, Yerevan, Armenia, p. 152.
5. Tigran **Harutyunyan**, Gohar Tadevosyan, Anzhela Sargsyan, Lily Kalashyan, Naira Stepanyan, Rouben Aroutiounian, Galina Hovhannisyan. 8-OHdG Elevation in Hypoxic COVID-19: A Potential Link to Inflammation and Disease Severity. Biological Sciences and Environmental Solutions for the Achievement of Sustainable Development Goals, September 24-26, 2025, Yerevan, Armenia, p.78.
6. Tigran **Harutyunyan**, Anzhela Sargsyan, Lily Kalashyan, Naira Stepanyan, Thomas Liehr, Rouben Aroutiounian, Galina Hovhannisyan. Leukocyte Telomere Length Changes in Hypoxic COVID-19 patients. Biological Sciences and Environmental Solutions for the Achievement of Sustainable Development Goals, September 24-26, 2025, Yerevan, Armenia, p.85.
7. R.M. Aroutiounian, G.G. Hovhannisyan, N. S. Babayan, A.A. Sargsyan, B.A. Grigoryan, T. Liehr, T.A. **Harutyunyan**. Genotoxic effects of low LET irradiation by electron pulses in human cells. The “Low dose radiation risks: present research and future perspectives” Advanced Research Workshop, NATO, 30.03.-02.04.2025, Yerevan, Armenia, p19.

8. L.A. Kalashyan, A.A. Sargsyan, B.A. Grigoryan, H.D. Davtyan, R.M. Aroutiounian, T. Liehr, G.G. Hovhannisyan, T.A. **Harutyunyan**. Telomere Lengths of Human Chromosomes as Potential Biomarkers of Genomic Instability Induced by Electron Beam Radiation. The “Low dose radiation risks: present research and future perspectives” Advanced Research Workshop, NATO, 30.03.-02.04.2025, Yerevan, Armenia, p41.
9. **Harutyunyan** TA, Sargsyan AA, Kalashyan LA, Igityan HA, Aroutiounian RM, Hovhannisyan GG. Cell-Free Mitochondrial DNA in Doxorubicin-Treated KCL22 and K-562 Cell Lines. *Proc YSU B Chem Biol Sci.* 2024;58(1):9-16.
10. **Harutyunyan** T, Sargsyan A, Kalashyan L, Stepanyan N, Aroutiounian R, Liehr T, Hovhannisyan G. DNA Damage in Moderate and Severe COVID-19 Cases: Relation to Demographic, Clinical, and Laboratory Parameters. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10293.
11. **Harutyunyan** T, Sargsyan A, Kalashyan L, Igityan H, Grigoryan B, Davtyan H, Aroutiounian R, Liehr T, Hovhannisyan G. Changes in Telomere Length in Leukocytes and Leukemic Cells after Ultrashort Electron Beam Radiation. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(12):6709.
12. **Harutyunyan** T. The known unknowns of mitochondrial carcinogenesis: de novo NUMTs and intercellular mitochondrial transfer. *Mutagenesis.* 2024;39(1):1-12.
13. Hovhannisyan G, **Harutyunyan** T, Aroutiounian R, Liehr T. The Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential of Cell-Free DNA with a Special Focus on COVID-19 and Other Viral Infections. *Int J Mol Sci.* 2023;24(18):14163.
14. **Harutyunyan** T. Analysis of doxorubicin-induced mitochondrial DNA deletions in human blood leukocytes and THP-1 cell line by PCR. *Proc YSU B Chem Biol Sci.* 2023; 57, 1 (260):32-40.
15. Tigran **Harutyunyan**, Anzhela Sargsyan, Nara Stepanyan, Galina Hovhannisyan, Lilit Ghoukasyan, Arsen Arakelyan, Rouben Aroutiounian. Genotoxicological and Molecular-Genetic Research of Coronavirus in Armenia. Armenian Meeting: “Climate Changes: Adaptation”, March 27–28, 2023, Yerevan, Armenia, p.7.
16. Tigran **Harutyunyan**, Anzhela Sargsyan, Nara Stepanyan, Galina Hovhannisyan, Rouben Aroutiounian. Evaluation of Genotoxic Effects in COVID-19 Patients as a Potential Marker of Virus-Host Adaptation. Armenian Meeting: “Climate Changes: Adaptation”, March 27–28, 2023, Yerevan, Armenia, p.8-10.
17. Barbaro V, Orvieto A, Alvisi G, Bertolin M, Bonelli F, Liehr T, **Harutyunyan** T, Kankel S, Joksic G, Ferrari S, Daniele E, Ponzin D, Bettio D, Salviati L, Di Iorio E. Analysis and pharmacological modulation of senescence in human epithelial stem cells. *J Cell Mol Med.* 2022;26(14):3977-3994.
18. Liehr T, **Harutyunyan** T, Williams H, Weise A. Non-Invasive Prenatal Testing in Germany. *Diagnostics.* 2022; 12(11):2816.
19. Kuchukyan ET, Sargsyan AA, **Harutyunyan** TA. Increase in the Level of Doxorubicin-Induced DNA Damage in HeLa Cells with CRISPR/Cas9 Mediated HIST1H1B Gene Knockout. *Phys. Part. Nuclei Lett.* 2022; 19(3):287–288.
20. Tigran **Harutyunyan**. FISH—Mitochondrial DNA. *Cytogenetics and Molecular Cytogenetics*, Taylor and Francis Group, USA, Thomas Liehr (Editor), 2022, Pages 251-263. ISBN: 9781003223658.
21. Tigran **Harutyunyan**, Anzhela Sargsyan, Rouben Aroutiounian. FISH—Detection of CNVs. *Cytogenetics and Molecular Cytogenetics*, Taylor and Francis Group, USA, Thomas Liehr (Editor), 2022, Pages 171-181. ISBN: 9781003223658.
22. Aroutiounian R., Hovhannisyan G., Sargsyan A., Al-Rikabi A., Liehr T., **Harutyunyan** T. Doxorubicin-induced mtDNA insertions in nuclear genome of human lymphocytes. Fifth International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky and His Scientific School “Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution”. Nor Amberd, October 5-10, 2021, p. 44.
23. **Harutyunyan** T, Al-Rikabi A, Sargsyan A, Hovhannisyan G, Aroutiounian R, Liehr T. Doxorubicin-induced translocation of mtDNA into the nuclear genome of human lymphocytes detected using a molecular-cytogenetic approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 7690.
24. **Harutyunyan** T, Hovhannisyan G, Sargsyan A, Liehr T, Al-Rikabi A, Aroutiounian R. Identification of cytogenetically visible mtDNA in interphase nuclei of human blood lymphocytes exposed to doxorubicin. *Proc. of the Yerevan State Univ. Chemistry and Biology.* 2020; 54(1):63-67.
25. Hovhannisyan G, **Harutyunyan** T, Aroutiounian R, Liehr T. DNA Copy Number Variations as Markers of Mutagenic Impact. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19). pii: E4723.

26. **Harutyunyan T**, Hovhannisyan G, Sargsyan A, Grigoryan B, Al-Rikabi AH, Weise A, Liehr T, Aroutiounian R. Analysis of copy number variations induced by ultrashort electron beam radiation in human leukocytes in vitro. *Mol Cytogenet.* 2019;12:18.
27. Р.М. Арутюнян, Г.Г. Оганесян, Б.А. Григорян, Т.А. **Арутюнян**, Н.С. Бабалян. Кинетика репарации ДНК и эпигенетические изменения при облучении сверхкороткими импульсами ускоренных электронов. Международная конференция “Современные вопросы радиационной генетики”, 27-28 июня, 2019, Дубна, Россия, с.16-19.
28. Hovhannisyan G, **Harutyunyan T**, Aroutiounian R. Micronuclei and what they can tell us in cytogenetic diagnostics. *Curr Genet Med Rep.* 2018; 6:1-11.
29. R. Aroutiounian, G. Hovhannisyan, B. Grigoryan, G. Tsakanova, S. Haroutiunian, T. **Harutyunyan**, N. Babayan. Genetic effects: DNA radiation damage and repair. *BRITE: Biomarkers of radiation in the environment: robust tools for risk assessment.* 2017, Yerevan, Armenia, p. 27.
30. **Harutyunyan T**, Babayan N, Aroutiounian R, Hovhannisyan G. Cell viability and DNA damage in MRC5 and HeLa cell lines after histone H1 knockout by CRISPR-Cas9 genome editing technology. *Proceedings of YSU, Chemistry and Biology*, 2016; 3:64–66.

ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ ՏԻԳՐԱՆ ԱՇՈՏԻ

ԳԵՆՈՄԱՅԻՆ ԱՆԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ԿԵՆՍԱՄԱՐԿԵՐՆԵՐԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ ՄԱՐԴՈՒ ԲԶԻԶՆԵՐՈՒՄ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր` գենոմային անկայունության կենսամարկերներ, ԴՆԹ-ի վնասվածքներ, ԴՆԹ-ի կրկնադրությունների թվի փոփոխություններ, միտոքոնդրիումային ԴՆԹ, արտաբջջային ԴՆԹ, թելոմերների երկարություն, 8-OHdG, COVID-19 հիվանդություն, ROC վերլուծություն

Կերջին տասնամյակներում մարդու վրա շրջակա միջավայրի ֆիզիկական, քիմիական և կենսաբանական գործոնների հարաճուն ազդեցությունն ուղեկցվում է նոր գենաթունային էֆեկտների բացահայտմամբ, ինչը պայմանավորում է դրանց գնահատման և մարդու առողջության համար ռիսկի կանխատեսման մոտեցումների կատարելագործման անհրաժեշտությունը: Գենաթունային գործոններով մակածված գենոմային անկայունությունը դրսևորվում է գենոմի կազմավորման տարբեր մակարդակներում սկսած նուկլեոտիդային փոփոխություններից և կորիզային ու միտոքոնդրիումային ԴՆԹ-ի (մտԴՆԹ) վնասվածքներից մինչև քրոմոսոմների կառուցվածքային խաթարումները, ներառյալ ինտերստիցիալ (այդ թվում՝ ԴՆԹ-ի կրկնադրությունների թվի փոփոխությունները (CNV)) և տերմինալ վնասվածքները, որոնցից են թելոմերների կարճացումը: Այդ համատեքստում գենոմային անկայունության կենսամարկերները խիստ կարևոր են՝ որպես գենոմի վնասվածքների քանակական գնահատման և ռիսկի կանխատեսման գործիքներ: Ուստի կատարված հետազոտության հիմնական նպատակն էր մշակել մարդու բջիջներում ֆիզիկական, քիմիական և կենսաբանական գործոններով մակածված գենոմային անկայունության կենսամարկերների *in vitro* համակարգ, ինչպես նաև ձևավորել դրանց կլինիկական նշանակության գնահատման մեթոդաբանական մոտեցումներ *in vivo* պայմաններում:

Գենոմային անկայունություն մակաձող էկզոգեն գործոններից է իոնացնող ճառագայթումը, որն առաջացնում է քրոմոսոմների ինտերստիցիալ և տերմինալ վնասվածքներ: Այս առումով CNV-ների և թելոմերների համալիր մոլեկուլային-բջջագենետիկական վերլուծությունը ֆլյուորեսցենտ *in situ* հիբրիդիզացիայի (FISH) մեթոդով թույլ է տալիս միաժամանակ գնահատել ինտերստիցիալ և տերմինալ վնասվածքները բջջային հետերոգենության պայմաններում:

Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ արագացված էլեկտրոններով ճառագայթահարումը մակաձում է CNV լոկուսների ամպլիֆիկացիաներ և թելոմերների կարճացում: Ցույց է տրվել CNV լոկուսների ոչ միատեսակ զգայնությունը ճառագայթման նկատմամբ, ինչպես նաև ամպլիֆիկացված CNV-ների և կրիտիկալաես կարճ թելոմերներով բջիջների հաճախականության բարձրացում: Ընդ որում արյան քաղցկեղի K-562 բջջային գծում թելոմերներն ավելի կարճ էին՝ համեմատած նորմալ արյան լեյկոցիտների: Ուստի լոկուս-սպեցիֆիկ և թելոմերային FISH վերլուծությունը կարելի է դիտարկել որպես ճառագայթմամբ գենոմում մակաձված ԴՆԹ-ի վնասվածքների անհավասարաչափ բաշխման գնահատման գործիք:

ԴՆԹ-ի վնասվածքների անհավասարաչափ բաշխում դիտվում է նաև միտոքոնդրիումային ԴՆԹ-ում (մտԴՆԹ), որտեղ հիստոնների բացակայությունն ու մտԴՆԹ-ի մոտ տեղակայումն ակտիվ ռադիկալների գոյացման սայթերին դարձնում է այն հակված սպոնտան մուտացիաների: Դոքսոռուբինը (DOX) հակառուցքային դեղամիջոց է, որը մակաձում է քրոմոսոմներում ԴՆԹ-ի երկշղթա վնասվածքներ և կուտակվում է միտոքոնդրիումներում, ինչը ուղեկցվում է օքսիդային սթրեսի ուժեղացմամբ և մտԴՆԹ-ի վնասվածքներով: Առաջին անգամ բացահայտվել է, որ DOX-ը մակաձում է ոչ միայն մտԴՆԹ-ի մուտացիաներ և արտաբջջային մտԴՆԹ-ի տարբեր հատվածներ, այլև մտԴՆԹ-ի ինսերցիաներ մարդու քրոմոսոմներում: Վերջիններիս քանակը դրական կոռելյացիայի մեջ է DOX-ով մակաձված միկրոկորիզների մակարդակի հետ, ինչը թույլ է տալիս պնդել քրոմոսոմային վնասվածքների ու մտԴՆԹ-ի ինսերցիաների միջև կապի մասին:

CRISPR-Cas9 մեթոդի կիրառմամբ մեր կողմից մշակվել են գենոմային անկայունությամբ բջջային գծեր՝ լինքերային հիստոն *H1-5* գենի նոքդաունի միջոցով, ինչը բարձրացնում է ԴՆԹ-ի և միկրոկորիզների վնասվածքների մակարդակները: Ընդ որում նոքդաունով բջիջներում DOX-ը դրսևորում էր ավելի բարձր գենաթունային ակտիվություն՝ համեմատած վայրի տիպի բջիջների հետ:

Մշակված *in vitro* կենսամարկերների հնարավոր նշանակությունը *in vivo* համակարգում գնահատելու նպատակով, որպես մոդել, մենք վերլուծել ենք գենոմային անկայունության կենսամարկերները COVID-19-ով հիվանդների խմբում՝ կախված հիվանդության ծանրությունից, հիվանդների սեռից և տարիքից: Բացահայտվել է, որ ծանր ընթացքով հիվանդների խմբում ԴՆԹ-կոմետների և 8-OHdG-ի՝ ԴՆԹ-ի օքսիդային վնասվածքների մարկերի արժեքներն ավելի բարձր են, իսկ արյան լեյկոցիտների ու բուկալ բջիջների թելոմերներն ավելի կարճ են՝ համեմատած առողջ մարդկան և միջին ծանրության հիվանդների հետ: Մակայն հիվանդներին ըստ սեռի և տարիքի խմբերում որպես հիվանդության ծանրությունը կանխատեսող առավել զգայուն չափանիշը լեյկոցիտների թելոմերների երկարությունն էր: COVID-19-ի միջին ծանրության ընթացքով տղամարդկանց խմբում ցույց է տրվել ԴՆԹ-կոմետների ավելի բարձր արժեքներ՝ համեմատած կանանց հետ,

մինչդեռ ծանր ընթացքի դեպքում կանանց խմբում նկատվել է 8-OHdG-ի մակարդակի բարձրացում, ինչը արտացոլում է գենաթունային և օքսիդային պատասխանի բնույթի տարբերությունները: COVID-19-ի ծանր ընթացքով ≥ 65 տարեկան հիվանդների խմբում դիտվել է 8-OHdG-ի բարձր մակարդակ և լեյկոցիտների թելոմերների ավելի արտահայտված կարճացում: 8-OHdG-ի և թելոմերների երկարության միջև բացասական կորելյացիան ցույց է տալիս, որ ԴՆԹ-ի օքսիդային վնասվածքները և թելոմերների կարճացումը ծանր COVID-19-ի դեպքում գենոմային անկայունության փոխկապակցված դրսևորումներ են:

Ընդհանուր առմամբ, հետազոտությունը թույլ տվեց մշակել գենոմային անկայունության մարկերների համալիր գնահատման մոտեցում, ցույց տալ դրանց ինֆորմատիվությունը գենոտոքսիկ ազդեցությունների պայմաններում և կապը COVID-19-ի ծանրության հետ, ինչը հիմք է ստեղծում դրանց տրանսլացիոն կիրառման համար՝ ստրատիֆիկացված կլինիկական դեպքերում:

HARUTYUNYAN TIGRAN ASHOT

DEVELOPMENT OF MARKERS OF GENOMIC INSTABILITY IN HUMAN CELLS

SUMMARY

Key words: biomarkers of genomic instability, DNA damage, DNA copy number variation, mitochondrial DNA, cell-free DNA, telomere length, 8-OHdG, COVID-19 disease, ROC analysis.

The diversity of mechanisms underlying genotoxic effects and the heterogeneity of cellular responses determine the relevance of developing and applying biomarkers that reflect both exogenous and endogenous mechanisms of genomic instability. Genotoxic factor-induced genomic instability manifests at different levels of genome organization, ranging from nucleotide alterations and damage to nuclear and mitochondrial DNA (mtDNA) to structural chromosome abnormalities, including interstitial lesions (among them copy number variations (CNVs)) and terminal lesions such as telomere shortening. In this context, biomarkers of genomic instability are of particular importance as tools for the quantitative assessment of genome damage and risk prediction. Therefore, the main aim of the present study was to develop an in vitro system of biomarkers for genomic instability induced by physical, chemical, and biological factors in human cells, as well as to establish methodological approaches for evaluating their clinical significance under in vivo conditions.

One of the exogenous factors inducing genomic instability is ionizing radiation, which causes both interstitial and terminal chromosome damage. In this regard, the combined molecular cytogenetic analysis of CNVs and telomeres by fluorescence in situ hybridization (FISH) makes it possible to simultaneously assess interstitial and terminal lesions under conditions of cellular heterogeneity. The obtained results show that irradiation with accelerated electrons induces amplification of CNV loci and telomere shortening. Uneven sensitivity of CNV loci to radiation

was demonstrated, as well as an increase in the frequency of amplified CNVs and cells with critically short telomeres. Moreover, telomeres were shorter in the K-562 leukemia cell line compared with normal blood leukocytes. Thus, locus-specific and telomeric FISH analysis can be considered a tool for assessing the uneven distribution of radiation-induced DNA damage in the genome.

An uneven distribution of DNA damage is also observed in mitochondrial DNA (mtDNA), where the absence of histones and the close proximity of mtDNA to sites of reactive radical generation make it prone to spontaneous mutations. Doxorubicin (DOX) is an anticancer drug that induces DNA double-strand damage in chromosomes and accumulates in mitochondria, which is accompanied by enhanced oxidative stress and mtDNA damage. For the first time, it was revealed that DOX induces not only mtDNA mutations and various fragments of extracellular mtDNA, but also mtDNA insertions into human chromosomes. The number of the latter positively correlates with the level of DOX-induced micronuclei, suggesting a relationship between chromosomal damage and mtDNA insertions.

Using the CRISPR-Cas9 method, we developed cell lines with genomic instability through knockdown of the linker histone H1-5 gene, which increased the levels of DNA damage and micronuclei. In these knockdown cells, DOX exhibited higher genotoxic activity compared with wild-type cells.

To evaluate the possible significance of the developed in vitro biomarkers in an in vivo system, we analyzed biomarkers of genomic instability in a group of COVID-19 patients depending on disease severity, sex, and age. It was found that patients with severe disease had higher values of DNA comet assay parameters and 8-OHdG, a marker of oxidative DNA damage, whereas telomeres in blood leukocytes and buccal cells were shorter compared with healthy individuals and patients with moderate disease. However, in patient groups stratified by sex and age, leukocyte telomere length was the most sensitive predictor of disease severity. In men with moderate COVID-19, higher DNA comet values were shown compared with women, whereas in severe disease, women exhibited elevated 8-OHdG levels, reflecting differences in the nature of genotoxic and oxidative responses. In patients, aged ≥ 65 years with severe COVID-19, increased 8-OHdG levels and more pronounced leukocyte telomere shortening were observed. The negative correlation between 8-OHdG and telomere length indicates that oxidative DNA damage and telomere shortening are interconnected manifestations of genomic instability in severe COVID-19.

Overall, the study made it possible to develop an approach for the comprehensive assessment of genomic instability markers, to demonstrate their importance under genotoxic stress and their association with COVID-19 severity, thereby creating a basis for their translational application in stratified clinical settings.

