

ПОКАЗАТЕЛЬ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ ВО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК МАРКЕР ДЛЯ МАЛОИНВАЗИВНОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ПРЯМОЙ КИШКИ

Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Удаленкова И.А., Фаткина Н.Б., Легостаев В.М., Шляхова О.В., Лиман Н.А., Карнаухова Е.А., Крохмаль Ю.Н., Кутилин Д.С.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: k.denees@yandex.ru

Лучевая терапия является ключевым компонентом лечения опухолей прямой кишки, однако, как показал анализ мировой и отечественной радиотерапевтической практики, отсутствие реакции у пациентов на предоперационную лучевую терапию весьма распространено и связано с формированием радиорезистентности опухолевых клеток, опосредованной определенными молекулярными аномалиями, такими как aberrантная транскрипционная активность генов. Особенности быстрой деградации молекул матричной РНК во внеклеточной среде делают показатель транскрипционной активности генов непригодным для подходов малоинвазивной диагностики. Решение проблемы возможно при переходе на более стабильный маркер, например показатель копияности генов (CNV, copy number variation), который возможно определить во внеклеточной ДНК, циркулирующей в плазме крови. Поэтому целью исследования стало выявление связи уровня CNV во внеклеточной ДНК плазмы крови с эффективностью лучевой терапии у больных раком прямой кишки. В работе использовали внеклеточную ДНК, выделенную из плазмы крови 32 пациентов с аденокарциномой прямой кишки и из плазмы крови 17 условно здоровых доноров. Лучевая терапия у больных раком прямой кишки проводилась на линейном ускорителе частиц Novalis TX. Анализ копияности 5 генетических локусов (*RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *BCL2*) проводили методом Real-Time qPCR. Данное исследование показало, что увеличение числа копий генов *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* и *BCL2* во внеклеточной ДНК плазмы крови ассоциировано с низкой эффективностью лучевой терапии. При этом показатель «копияность генов *H2AX* и *RBBP8*» во внеклеточной ДНК больных раком прямой кишки обладает наибольшим потенциалом в качестве маркера, позволяющего прогнозировать эффективность лучевой терапии.

Ключевые слова: рак прямой кишки, лучевая терапия, копияность генов, репарация двуцепочечных разрывов, апоптоз, радиорезистентность.

GENES COPY NUMBER VARIATION INDEX IN CELL-FREE DNA OF BLOOD PLASMA AS A MARKER FOR LOW INVASIVE EFFICIENCY ASSESSMENT OF RECTAL TUMORS RADIOTHERAPY

Kosheleva N.G., Gusareva M.A., Udalenkova I.A., Fatkina N.B., Legostaev V.M., Shlyakhova O.V., Liman N.A., Karnaukhova E.A., Krokhmal Y.N., Kutilin D.S.

National Medical Research Oncology Center, Rostov-on-Don, e-mail: k.denees@yandex.ru

Radiation therapy is a key component of the treatment of rectal tumors, however, as shown by the analysis of world and domestic practice, cases of non-response in patients to preoperative radiation therapy are very common, which is usually associated with the radioresistance of tumor cells, mediated by their molecular characteristics, such as the indicator of gene expression. The features of the rapid degradation of messenger RNA molecules in the extracellular environment make the indicator of gene transcriptional activity unsuitable for low invasive diagnostic approaches. The solution to the problem is possible by switching to a more stable marker, for example, the copy number variation (CNV), which can be determined in the extracellular DNA circulating in the blood plasma. Therefore, the aim of the study was to identify the relationship between the level of copy number of genes in the extracellular DNA of blood plasma with the effectiveness of rectal tumors radiation therapy. We used extracellular DNA preparations from blood plasma of 32 patients with rectal adenocarcinoma and 17 apparently healthy donors. Radiation therapy in patients with rectal cancer was performed on a Novalis TX linear accelerator. Determination of the relative copy number of 5 genetic loci (*RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9*, *BCL2*) was performed using the Real-Time qPCR (RT-qPCR) method. The study made it possible to establish that the increased copy number of genes *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2*, *RBBP8* in the extracellular DNA of blood plasma is associated with a low efficiency of radiation therapy. Moreover, the copy number of the *H2AX* and *RBBP8* genes in the extracellular DNA of patients with rectal cancer has the greatest potential as a marker of the effectiveness of radiation therapy.

Keywords: rectal cancer, radiation therapy, genes copy number variation, repair of double-strand breaks, apoptosis, radioresistance.

Во всем мире по числу летальных случаев среди онкологических заболеваний злокачественные новообразования кишечника занимают 4-е место: в 2019 г. зарегистрировано более 550 тыс. случаев смерти от этого заболевания, причем наибольшее количество из них приходилось на опухоли прямой кишки [1]. В последние годы в лечении этих опухолей применяются комбинированные подходы, сочетающие выполнение предоперационной лучевой терапии (ЛТ) и хирургическое вмешательство [2, 3]. Курс лучевой терапии с разовой очаговой дозой (РОД) 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы (СОД) 54 Гр входит в стандартную схему лечения. Однако анализ мировой и отечественной радиотерапевтической практики показал, что отсутствие реакции у пациентов на предоперационную ЛТ весьма распространено и связано, как правило, с формированием радиорезистентности опухолевых клеток. Превращение нормального эпителия прямой кишки в предраковое поражение и, в конечном итоге, в инвазивную карциному требует накопления генетических и эпигенетических аномалий. Теория колоректального канцерогенеза включает клональную эволюцию, которая дает преимущество в выживаемости и бессмертии определенным клеткам и позволяет сохранять больше молекулярных аномалий, определяющих признаки данного рака, такие как пролиферация, инвазия, метастазирование и радиорезистентность. Последняя может быть опосредована, в частности, aberrантной транскрипционной активностью генов. Так, ранее нами было установлено, что транскрипционная активность генов, регулирующих репарацию ДНК (*BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*), пролиферацию клеток и апоптоз (*CASP9* и *BCL2*), влияет на эффективность лучевой терапии у больных раком прямой кишки [1]. Соответственно, возможно было бы предложить использование этих показателей в прогнозировании эффективности проводимой терапии. Однако транскрипционная активность генов является не очень стабильным показателем. К тому же матричная РНК достаточно быстро деградирует во внеклеточной среде [4], что делает невозможным применение подходов малоинвазивной диагностики с использованием этих маркеров.

Решение проблемы возможно при переходе на более стабильный маркер, сохраняющий свою целостность в биологических жидкостях организма, например плазме крови. К таким маркерам можно отнести показатель копийности генов (CNV, copy number variation), который возможно определить во внеклеточной ДНК, циркулирующей в плазме крови [5]. К тому же в работе Д.С. Кутилина и соавторов [6] было продемонстрировано важное значение показателя CNV ряда генов в прогнозировании устойчивости опухолевых клеток к облучению. CNV представляет собой особую группу генетических полиморфизмов,

не нарушающих функцию белка или некодирующей рибонуклеиновой кислоты, но изменяющих дозу гена (число его копий), а следовательно, и уровень его транскрипционной активности [5, 6]. Так как прогностическое значение уровня экспрессии генетических локусов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и *BCL2* уже известно, логично исследовать далее именно показатель копийности этих генов во внеклеточной ДНК, к которой относят ДНК из ядер и митохондрий разрушенных (апоптоз/некроз) соматических и опухолевых клеток, ДНК из эритробластов и лимфоцитов, вирусную и бактериальную ДНК [7].

Целью данной исследовательской работы стала оценка влияния аномалий в уровне копийности указанных выше генов во внеклеточной ДНК на эффективность ЛТ у больных раком прямой кишки.

Материалы и методы исследования

В работе приняли добровольное участие 32 пациента со злокачественными новообразованиями прямой кишки (аденокарцинома G1-2, возраст от 45 до 65 лет), проходившие лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии» МЗ РФ в 2019 г., а также 17 условно здоровых доноров (без онкологических заболеваний). Для исследования использовали препараты внеклеточной ДНК (внДНК) из плазмы крови, полученной от доноров и пациентов до ЛТ, которая проводилась по стандартной схеме (РОД 2,4 Гр, СОД 54 Гр) на линейном ускорителе Novalis TX.

Подготовку препаратов внеклеточной ДНК проводили следующим образом: кровь, полученную путем венопункции, смешивали с фосфатным буфером (10 мМ, рН 7,5), содержащим 150 мМ хлорида натрия и 50 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты. Полученную смесь разделяли центрифугированием (20 мин, 400g, 15°C) на плазму и фракцию клеток [8]. внДНК выделяли фенол-хлороформным методом в модификации Кутилина и соавторов [7]: к плазме добавляли лизирующий раствор (2% SDS, 1% меркаптоэтанол, протеиназы К) и инкубировали 60 мин при 58°C; далее лизат смешивали с щелочным фенолом, центрифугировали (20 мин, 400g); отбирали водную фазу и добавляли к ней 96%-ный изопропиловый спирт и 5 М хлорид натрия (до концентрации 100 мМ), инкубировали при -20°C 60 мин; далее центрифугированием осаждали осадок, содержащий ДНК, высушивали и растворяли в Tris-EDTA-буфере.

Оценку уровня относительной копийности генетических локусов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и *BCL2* проводили методом Real-Time qPCR, в основе которого лежит одновременная амплификации целевого и референсного гена в опытной и контрольной пробах, с последующим анализом соотношения сигналов, продуцируемых ампликонами изучаемой и референсной последовательностей [7].

Смесь для Real-Time qPCR включала 2,5 нг вДНК, 0,2 мМ dNTP, по 600 нМ праймеров, 2,5 мМ MgCl₂, однократный ПЦР-буфер, 0,1 ед./μl SynTaq ДНК-полимеразы и однократную концентрацию интеркалирующего красителя EvaGreen®Dye. Real-Time qPCR проводилась по стандартной программе 95°C 3 мин и далее 40 циклов: 95°C 10 с, 58°C 30 с (чтение оптического сигнала, канал FAM), 72°C 30 с.

Праймеры для Real-Time qPCR были разработаны нами с использованием базы данных NCBI GenBank (табл.). Генетический локус *GAPDH* (кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу) использовался в качестве референсного для нормализации полученных показателей Ct.

Перечень праймеров для определения CNV генов [6]

№	Праймер	Последовательность	Праймер	Последовательность
1	BRCA2_F	TGCATCCCTGTGTAAGTGCTT	BRCA2_R	ACGTAAGCGGCTTCTTAGCAAGC
2	H2AX_F	AGGCCTCCCAGGAGTACTAA	H2AX_R	CTGAAGCGGCTCAGCTCTCT
3	RBBP8_F	ACCGAGGATTTGGCACTCTG	RBBP8_R	TCCGAGATTGCCTCGGGACT
4	BCL2_F	GAGTGGGATGCGGGAGATG	BCL2_R	GGTGAAGGGCGTCAGGTG
5	CASP9_F	CTCCACTTCCCCTGAAGACG	CASP9_R	CTGGGTGTGGGCAAAGTAGA
6	GAPDH_F	GCTGAACGGGAAGCTCACT	GAPDH_R	GCAGGTTTTTCTAGACGGCACG

Примечание: F – прямой (forward) праймер, R – обратный (reverse) праймер.

Среднее геометрическое Ct каждого гена нормализовалось по среднему геометрическому Ct референсного гена для получения величины ΔCt. Показатель копийности генетического локуса (**RQ**) вычисляли по формуле $RQ = E^{-\Delta Ct}$, где E – рассчитанный показатель эффективности амплификации: $E = 10^{-1/h}$, где h – коэффициент из уравнения $Ct = h * \log P_0 + a$. Далее вычисляли медиану RQ_{оп}(опухолевых образцов) и медиану RQ_к(контрольных образцов (плазма условно здоровых доноров)) для каждого гена и рассчитывали соотношение RQ_{оп}/RQ_к [5, 7].

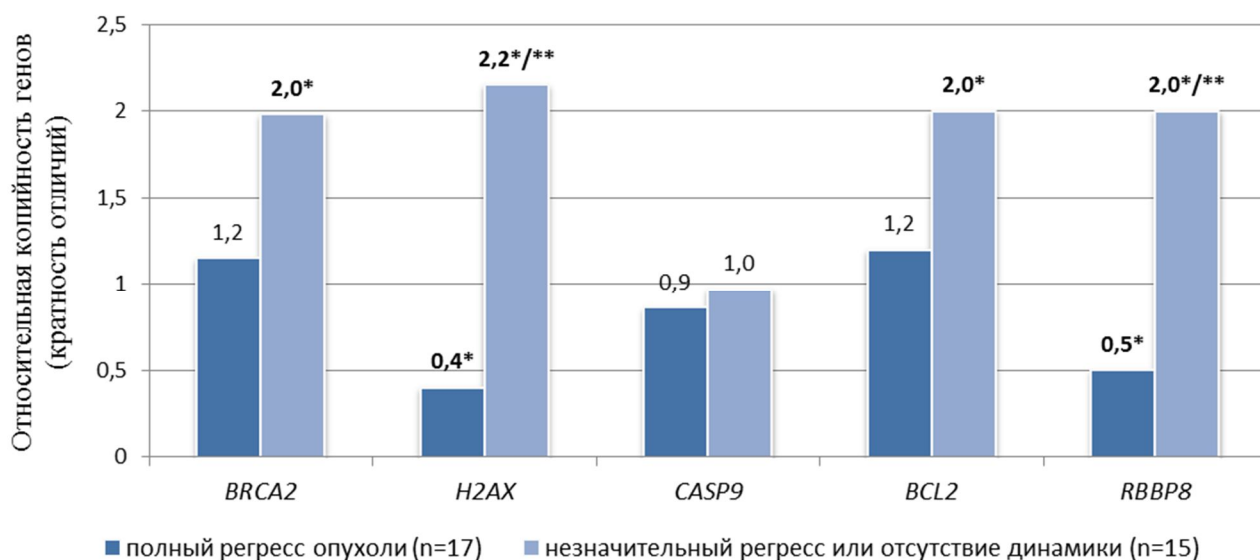
Полученные данные обрабатывали в среде программирования R. Нормальность распределения показателей в каждой из групп определяли с использованием критерия Шапиро–Уилка (n<50). Для описания корреляционных связей применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Статистическую значимость различий оценивали по критерию Манна–Уитни, для корректировки множественного сравнения применяли поправку Бонферрони [9].

Результаты исследования и их обсуждение

Высокий уровень вДНК в периферической крови – маркер многих видов злокачественных новообразований. Его постепенное повышение часто ассоциировано с

прогрессом заболевания, а также уровень вДНК нередко возрастает при метастазировании [10].

У 17 условно здоровых доноров и у 32 больных раком прямой кишки (до видеоколоноскопии и лучевой терапии) путем венопункции собирали кровь, далее из плазмы выделяли вДНК. Анализ отдаленных результатов ЛТ рака прямой кишки у 32 пациентов позволил разделить их на две группы. В первой группе наблюдался полный регресс опухоли после ЛТ (17 пациентов), во второй группе у 8 пациентов наблюдался незначительный регресс опухоли, у 7 пациентов регресс отсутствовал. О степени патоморфоза опухоли или его отсутствии судили по данным МРТ (магнитно-резонансной томографии) и ВКС (видеоколоноскопии) через 1,5–2 месяца после облучения. В выявленных двух группах пациентов и в группе условно здоровых доноров проводилось определение показателя копийности генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *BCL2* и *CASP9* во вДНК плазмы крови (рис.).



*Показатель CNV генетических локусов во вДНК у больных раком прямой кишки, чувствительных и резистентных к лучевой терапии, относительно CNV генетических локусов во вДНК условно здоровых доноров. * – статистически значимые отличия ($p < 0,05$) относительно условно здоровых доноров, ** – статистически значимые отличия ($p < 0,005$) относительно группы с полным регрессом*

До лучевой терапии во вДНК больных раком прямой кишки с последующим полным регрессом опухоли обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение копийности генов *H2AX* и *RBBP8* в 2,5 и 2,0 раза соответственно относительно группы условно здоровых доноров. При этом копийность генов *BRCA2*, *BCL2* и *CASP9* не отличалась от копийности в группе условно здоровых доноров. До лучевой терапии во вДНК больных раком прямой

кишки второй группы обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение CNV генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2* – в 2,0 раза, в 2,2 раза, в 2,0 и в 2,0 раза соответственно – относительно CNV группы условно здоровых доноров. При этом копийность гена *CASP9* не отличалась от копийности в группе условно здоровых доноров.

Следует также отметить, что между CNV генов во вДНК плазмы крови и экспрессией генов в опухолевой ткани (биопсия во время видеокколоноскопии [1]) у больных раком прямой кишки практически во всех случаях наблюдалась сильная положительная корреляция: для гена *BRCA2* $r=0,750$ и $r=0,890$; для гена *H2AX* $r=0,898$ и $r=0,887$; для гена *RBBP8* $r=0,908$ и $r=0,901$; для гена *BCL2* $r=0,880$ и $r=0,704$ и для гена *CASP9* $r=-0,161$ (исключение) и $r=0,918$ соответственно для пациентов с полным регрессом и незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики.

Копийность только двух генетических локусов во вДНК статистически значимо ($p < 0,005$) отличалась в первой группе от этого показателя во второй группе: копийность гена *H2AX* была меньше в 5,4 раза, а гена *RBBP8* – в 4,0 раза.

Возможным эффектом, опосредованным изменением копийности этих генов, может быть изменение последовательности событий, необходимых для репарации двунитевых разрывов ДНК. Ионизирующее излучение, воздействуя на клетку, приводит к индукции двуцепочечных разрывов ДНК, после чего должна запускаться цепь событий, направленных на элиминацию этих структурных аномалий в молекуле. Известно, что для этого хроматин должен быть деконденсирован (ремоделирован), так как конденсированный эукариотический хроматин представляет преграду для многих биологических процессов, связанных с присоединением ферментов к определенным локусам ДНК [1].

В одном из ключевых этапов этого процесса и задействован ген *H2AFX* (*H2AX*, H2A histone family member X), кодирующий гистоновый белок, который в ответ на ионизирующее излучение фосфорилируется по серину и переходит в модифицированную форму γ H2AX. Из-за этого хроматин становится менее конденсированным, и белковые комплексы, необходимые для осуществления процесса репарации, могут к нему присоединиться [11]. В частности, к модифицированному молекулярным комплексом, состоящим из белков γ H2AX и MDC1, хроматину могут присоединиться белки BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) [12], Mre11, Rad50, Nbs1, RAD51 и ATM [13]. Важную роль непосредственно в процессе репарации двуцепочечного разрыва в ДНК играет белок RAD51, однако для его перелокализации к месту разрыва требуется образование комплекса BRCA1-PALB2-BRCA2 (Breast cancer type 2 susceptibility protein) [14]. Образованию этого комплекса способствует белок, кодируемый геном *RBBP8* (Retinoblastoma-binding protein 8), который оказывает модулирующее воздействие на активность BRCA1 [15].

BRCA2 и *BRCA1* экспрессируются в клетках многих тканей, где они участвуют в восстановлении поврежденной ДНК или разрушении клеток, если ДНК не может быть восстановлена. Они играют важную роль в безошибочном восстановлении двуцепочечных разрывов ДНК. У людей белок *BRCA2* в первую очередь способствует упорядоченной сборке *RAD51* на одноцепочечной ДНК [13, 14]. В ряде исследований установлена гиперэкспрессия *BRCA2* в тканях различных спорадических опухолей, в других исследованиях сообщается о гипоекспрессии *BRCA2* [14, 15].

Многие опухоли имеют эпигенетические аномалии в различных генах репарации ДНК. Эти дефекты, вероятно, вызывают увеличение невосстановленных повреждений ДНК. Сверхэкспрессия *BRCA2* может отражать компенсаторный эффект, направленный на устранение избыточных повреждений ДНК. Также предполагают, что повышенная экспрессия *BRCA2* может быть объяснена нестабильностью генома, часто наблюдаемой при раке, которая индуцирует экспрессию мРНК *BRCA2* [15].

Учитывая описанное выше, можно предположить, что повышенное число копий генов *BRCA2*, *H2AX* и *RBBP8* может усиливать транскрипционную активность соответствующих генов, тем самым увеличивая эффективность работы системы репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Продукт гена *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) является антиапоптозным белком, контролирующим проницаемость митохондриальной мембраны и ингибирующим каспазы за счет предотвращения выхода цитохрома С из митохондрий и за счет связывания белка *APAF1*, активирующего апоптоз [1]. Поэтому повышенная копияность данного гена может приводить к увеличению его транскрипционной активности и тем самым ингибировать апоптотические процессы, запущенные после воздействия ЛТ.

Важно отметить, что статистически значимого изменения копияности гена *CASP9* обнаружено не было как по сравнению с уровнем копияности во внДНК плазмы крови условно здоровых доноров, так и между двумя группами пациентов с разной чувствительностью к лучевой терапии. Вероятно, изменение транскрипционной активности *CASP9*, обнаруженное нами ранее [1], регулируется иными молекулярными механизмами. Ген *CASP9* кодирует инициаторную каспазу, критическую для запуска апоптоза [1]: при инициации апоптоза из митохондрий высвобождается цитохром С и активируется белок *APAF1*, который расщепляет про-фермент каспазы-9, переводя его в активную форму, которая расщепляет каспазы-3, -6 и -7, запуская каспазный каскад, расщепляющий другие клеточные мишени и приводящий к реализации запрограммированной клеточной гибели [1].

В целом, учитывая данные корреляционного анализа, можно предположить, что повышенная копияности генов, регулирующих репарацию ДНК и пролиферацию (*BRCA2*,

H2AX, BCL2, RBBP8) во вДНК плазмы крови у больных раком прямой кишки с незначительным регрессом опухоли или отсутствием динамики, отражает их копийность в тканях опухоли, где она обеспечивает соответствующий уровень транскрипционной активности этих генов, что и приводит в итоге к снижению эффективности проводимой ЛТ.

Заключение

Таким образом, в ходе данного исследования была установлена связь повышенного количества копий генов *BRCA2, H2AX, BCL2, RBBP8* во вДНК плазмы крови с низкой эффективностью лучевой терапии у больных раком прямой кишки. При этом показатель копийности генов *H2AX* и *RBBP8* во вДНК больных раком прямой кишки обладает наибольшим потенциалом в качестве малоинвазивного маркера эффективности лучевой терапии.

Коллектив авторов выражает благодарность Д.С. Потемкину (м.н.с. лаборатории молекулярной онкологии «НМИЦ онкологии») за помощь в сборе, систематизации и обработке биологического материала.

Исследование выполнено в рамках гос. задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонифицированных неоадьювантных терапевтических подходов».

Список литературы

1. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А., Харагезов Д.А., Донцов В.А., Полуэктов С.И., Зема Т.В., Лиман Н.А., Шляхова О.В., Удаленкова И.А. Влияние транскрипционной активности генов, регулирующих репарацию ДНК, на эффективность лучевой терапии опухолей прямой кишки // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29353> (дата обращения: 26.11.2020).
2. Fazeli M.S., Keramati M.R. Rectal cancer: a review. Med. J. Islam Repub. Iran. 2015. V. 29. P. 171.
3. Glimelius B. The Swedish Approach. In: Kwaan M., Zbar A. (eds) Comprehensive Rectal Cancer Care. Springer. Cham, 2019. P. 335-353.
4. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Extracellular nucleic acids in urine: sources, structure, diagnostic potential. Acta Naturae. 2015. V. 7. No 3 (26). P. 48-54.
5. Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Карнаухов Н.С., Кит О.И. Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой лёгкого // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019. Т. 167. № 6. С. 731-738.

6. Кутилин Д.С., Зинькович М.С., Гусарева М.А., Фаенсон А.В., Карнаухова Е.А., Розенко Л.Я., Фаткина Н.Б., Удаленкова И.А., Васильева Е.О., Гаппоева М.А. Копийность генов как фактор устойчивости опухолевых клеток предстательной железы к облучению // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 4. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29866> (дата обращения: 26.11.2020).
7. Кутилин Д.С., Айрапетова Т.Г., Анистратов П.А., Пыльцин С.П., Лейман И.А., Чубарян А.В., Туркин И.Н., Водолажский Д.И., Николаева Н.В., Лысенко И.Б. Известия высших учебных заведений. Изменение относительной копииности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого // Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2017. № 3-2 (195-2). С. 74-82.
8. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е. Циркулирующие НК в крови больных раком желудка и толстой кишки // Клинические исследования. 2005. Т. 51 (3). С. 321-328.
9. Цандекова М.Р. Показатель копииности генов, регулирующих метаболизм и рецепцию эстрогенов, во внеклеточной ДНК как потенциальный маркер для диагностики серозной аденокарциномы яичника высокой степени злокачественности // Современные проблемы науки и образования. 2020. № 5. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=30093> (дата обращения: 26.11.2020).
10. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15. (5). С. 399-412.
11. Ayoub N., Jeyasekharan A.D., Bernal J.A., Venkitaraman A.R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature*. 2008. V. 453 (7195). P. 682-686.
12. Scully R., Xie A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutat. Res.* 2013. V. 750 (1-2). P. 5-14.
13. Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M.B., Bartek J., Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* 2006. V. 173 (2). P. 195-206.
14. Wang C.X., Jimenez-Sainz J., Jensen R.B., Mazin A.V. The Post-Synaptic Function of Brca2. *Scientific Reports*. 2019. V. 9 (1). P. 4554.
15. Sartori A.A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007. V. 450 (7169). P. 509-514.