

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ –
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ А.И. БУРНАЗЯНА»

На правах рукописи

ЦИШНАТТИ АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ВЫЖИВШИХ И
ДАВШИХ УСТОЙЧИВЫЙ РОСТ ПОСЛЕ ОСТРОГО РЕНТГЕНОВСКОГО
ОБЛУЧЕНИЯ

Специальность 1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Гурьев Денис Владимирович

Москва, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ	15
1.2. МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК	23
1.3. РОЛЬ БЕЛКА p53 В ФОРМИРОВАНИИ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ.....	37
1.4. СТЕРЕОТАКСИЧЕСКАЯ РАДИОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И УСЛОВИЯ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	49
2.2. УСЛОВИЯ РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ.....	51
2.3. СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА	53
2.4. КРИВЫЕ РОСТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВРЕМЕНИ УДВОЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ.....	54
2.5. ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ОКРАШИВАНИЕ НА GN2AX И KI-67	54
2.6. ОЦЕНКА КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ И СТАДИЙ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА.....	58
2.7. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ).....	59
2.8. КЛОНОГЕННЫЙ ТЕСТ.....	60
2.9. АНАЛИЗ МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА ЗАЖИВЛЕНИЯ «РАНЫ» («SCRATCH TEST»).....	61
2.10. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	64

3.1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ВЫЖИВШИХ И ИСХОДНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.....	64
3.2. АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫЖИВШИХ И ИСХОДНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПО ФАЗАМ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПОСЛЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ.....	70
3.3. АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ВЫЖИВШИХ И ИСХОДНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ.....	74
3.4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ОСТАТОЧНЫХ ФОКУСОВ РЕПАРАЦИИ ДР ДНК У ИСХОДНЫХ И ВЫЖИВШИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.....	80
3.5. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИСХОДНЫХ И ВЫЖИВШИХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.....	83
3.6. ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНОЙ ГИБЕЛИ ИСХОДНЫХ И ВЫЖИВШИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ В РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ.....	88
3.7. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МИГРАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ТЕСТА НА ЗАЖИВЛЕНИЕ «РАНЫ» («СКРЕТЧ-ТЕСТ».).....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	100
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104
ПРИЛОЖЕНИЕ	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Несмотря на наметившийся прогресс в понимании механизмов возникновения злокачественных новообразований, диагностики и лечения, наблюдается рост заболеваемости, что делает это проблемой 21 века [1]. Как известно, лечение включает в себя лучевую терапию, хирургию, химиотерапию, иммунотерапию и гормональную терапию. Лучевая терапия (ЛТ) остается одним из основных видов лечения и составляет примерно 50%, что, в свою очередь, приводит к успеху в терапии лишь в 40% случаев [2]. Основная цель лучевой терапии состоит в подавлении способности злокачественных новообразований к клеточному делению. Кроме классической радиотерапии, в последнее время широкое распространение получила стереотаксическая лучевая терапия [3], при которой используются одномоментно очень высокие дозы облучения для быстрой и точной элиминации опухолей в труднодоступных местах или возле жизненно важных органов. Особенностью этого вида терапии является короткий курс, когда пациент получает одну дозу облучения (радиохирургия) или несколько, не более пяти, фракций. Разовая очаговая доза (РОД) высока (десятки Гр) и может варьировать в широких пределах в зависимости от вида и локализации опухоли. Успех в радиотерапии определяется множеством факторов, среди которых одну из ключевых ролей играет резистентность опухолевых клеток к облучению в больших дозах. Именно поэтому разработка более эффективной стратегии лучевой терапии требует глубокого понимания молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе формирования устойчивости опухолевых клеток к воздействию ионизирующего излучения [4]. С момента открытия рентгеновских лучей были предприняты попытки получения радиорезистентных клеток путем использования ионизирующего излучения или мутагенов, однако согласованных механизмов клеточной радиорезистентности так и не было выявлено, что,

по-видимому, связано с различиями изучаемых клеток по своему происхождению [5].

Опухолевая ткань представляет собой набор гетерогенных клеток с различными генетическими и фенотипическими свойствами, которые определяют ее способность к развитию, метастазированию и устойчивости к лечению [6]. По этой причине сравнительные исследования эффектов радиационного воздействия на исходные клетки опухоли и на выжившие потомки этих клеток после острого облучения могут дать в дальнейшем возможность усовершенствовать протоколы лечения онкобольных [11].

Ионизирующее излучение вызывает различные виды повреждений структуры ДНК. Поскольку двунитевые разрывы (ДР) ДНК считаются одними из наиболее критичных клеточных повреждений, индуцированных ионизирующим излучением, то последствиями их накопления может быть как клеточная гибель, так и последующие различные эпигенетические изменения [7].

Корреляция между клеточной радиочувствительностью и эффективностью репарации ДР ДНК была изучена в различных линиях опухолевых клеток, однако связь между радиорезистентностью опухолевых клеток и способностью их к репарации ДНК все еще остается спорной [8]. Эти расхождения объясняются, с одной стороны, использованием различных методов определения клеточной радиорезистентности и, с другой, что сравнение проводится среди клеток с различными геномными профилями [9].

Таким образом, для выяснения механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток человека к радиационному воздействию необходимо комплексно оценить и охарактеризовать молекулярно-клеточные изменения в популяции опухолевых клеток, способных выживать после острого облучения в больших дозах [18].

Степень разработанности темы исследования

Вопросы радиорезистентности опухолей давно находятся в центре внимания мирового научного сообщества. Первые систематизированные

представления о важности внутритканевой гетерогенности опухолей были предложены ещё в конце XX века трудами американских ученых, таких как [10]. Дальнейшее развитие эта идея получила в исследованиях британских и немецких коллективов [11, 13, 16], которые показали важность внутриклеточной и тканевой неоднородности опухолей, приводящей к развитию радиорезистентности.

Особенное значение приобрело изучение молекулярных механизмов, вовлечённых в процессы восстановления поврежденной цепи ДНК, вызванной воздействием ионизирующего излучения. Исследования групп [22, 23, 25] демонстрируют, что репарация ДР ДНК играет ключевую роль в устойчивости опухолевых клеток к облучению.

Современный этап исследований характеризуется повышенным вниманием к роли экзосом (онкосом), участвующих в передаче сигналов между опухолевыми клетками и факторами микроокружения. Работы [35, 36, 38] раскрывают потенциал экзосом в индукции радиорезистентности и поддержании жизнеспособности опухолевых клеток после облучения.

Кроме того, значительным достижением стало выявление участия определенных белков, таких как Cdc25c, в процессах, связанных с изменением клеточного цикла и повышением устойчивости опухолевых клеток к радиационному воздействию, что показано в работах китайских ученых [23, 25].

Авторы отмечают растущую популярность теории, согласно которой опухоли развиваются из небольшого числа опухолевых стволовых клеток (ОСК), обладающих повышенной способностью к самовосстановлению и воспроизведению. Группа исследователей под руководством Yoshida G.J., Saya H. предложила концепцию противоопухолевой терапии, основанной на устранении именно этих клеток.

Ряд авторов подчеркивает ключевой вклад регуляторов транскрипционного фактора p53 в поддержании баланса между ростом клеток и развитием защитного стресса. Согласно работам [83, 84, 85, 87, 95] активация и стабилизация p53 приводят к запуску многочисленных эффекторных генов, таких как p21, BAX, Noxa, Puma, что усиливает запрограммированную гибель клеток и предотвращает

образование канцерогенных мутаций.

Вместе с тем, остаётся целый ряд нерешённых проблем. Несмотря на обширные исследования, продолжается дискуссия относительно механизмов передачи сигналов и регулирования радиорезистентности. Современная медицинская практика всё чаще сталкивается с необходимостью индивидуально подходить к выбору режимов радиотерапии и применению комбинации лекарств для повышения эффективности лучевого лечения.

Исследование радиорезистентности продолжает оставаться актуальным направлением биологических и медицинских наук, нуждающимся в дальнейшем совершенствовании наших представлений о молекулярно-клеточных основах устойчивости опухолей к действию ионизирующих излучений. Предложенная работа направлена на дальнейшее изучение существующих механизмов радиорезистентности.

Цель исследования

Цель работы – дать молекулярно-генетические и клеточные характеристики опухолевым клеткам человека, выжившим и активно пролиферирующим после острого рентгеновского облучения с последующим радиационным воздействием.

Задачи

1. Получить выжившие опухолевые клетки человека линий A549 (карцинома легкого человека), HeLa (карцинома шейки матки) и H1299 (p53-дефицитные клетки немелкоклеточного рака легкого) после рентгеновского облучения в дозе 15 Гр;
2. Дать сравнительную оценку времени удвоения популяции выживших после облучения и исходных опухолевых клеток человека линий A549, H1299 и HeLa;
3. Дать сравнительную характеристику клеточной гибели и проанализировать изменения в клеточном цикле контрольных и выживших после облучения опухолевых клеток человека линий A549, H1299 и HeLa с последующим рентгеновским облучением в дозах 5 и 10 Гр;

4. Сравнить уровень остаточных фокусов репарации двунитевых разрывов ДНК и цитогенетических нарушений (микроядер) в контрольных и выживших после облучения опухолевых клетках человека линий A549, H1299 и HeLa с последующим рентгеновским облучением в дозах 5 и 10 Гр;

5. Изучить клоногенную и миграционную способности выживших и исходных опухолевых клеток человека линий A549, HeLa и H1299 после острого рентгеновского облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр.

Научная новизна

Впервые получены и охарактеризованы выжившие и активно пролиферирующие опухолевые клетки человека A549RR (исходная линия A549), HeLaRR (HeLa) и p53-дефицитные H1299RR (H1299) после острого воздействия рентгеновским излучением в дозе 15 Гр. Впервые проведены эксперименты с использованием широкого спектра молекулярно-генетических и цитологических методов для сравнительной оценки характеристик выживших после острого облучения опухолевых клеток трех линий с различными вариантами последующего радиационного воздействия. У выживших клеток была отмечена значительная пролиферативная задержка, выражавшаяся в увеличении времени удвоения популяции по сравнению с контрольными клетками без дополнительного облучения. Выявлена возможная причина этого эффекта, а именно увеличение времени удвоения популяции выживших клеток A549RR и H1299RR связано с высоким уровнем гибели этих клеток, у клеток HeLaRR, скорее всего, связано с увеличением времени прохождения стадий клеточного цикла. Данные получены на основании анализа клеточной гибели, распределения по стадиям клеточного цикла и экспрессии маркера клеточной пролиферации. В качестве маркера использовали иммуноцитохимически окрашиваемый белок Ki-67, который также позволил установить дозозависимое снижение пролиферативного потенциала клеток линии A549 и A549RR. Иммуноцитохимическим и цитогенетическим методами выявлено значительное снижение уровня как остаточных фокусов ДР ДНК, так и микроядер в выживших

клетках A549RR и HeLaRR по сравнению с исходными клетками после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр.

Обнаружено, что выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки H1299RR имеют значительный процент гибели, как без облучения, так и через 24 часа после воздействия в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с исходными клетками. Противоположная картина наблюдалась для линии A549: через сутки после дополнительного облучения в тех же дозах процент гибели был существенно выше у исходных клеток, чем у A549RR. Гибель клеток HeLa и HeLaRR возрастала с увеличением дозы, однако статистически значимых различий между ними выявлено не было.

В работе использовали клоногенный тест, позволивший определить высокую степень устойчивости выживших после острого облучения в дозе 15 Гр опухолевых клеток после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр.

Впервые было выявлено, что миграционная активность опухолевых клеток, играющая одну из ключевых ролей в метастазировании и репопуляции опухоли, оказалась значительно выше у выживших клеток A549RR и HeLaRR по сравнению с исходными. При этом клетки H1299 и H1299RR проявляли максимальную и устойчивую к облучению миграционную активность среди всех изученных клеток, которая сохранялась при дополнительном облучении в дозах 2-6 Гр.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные имеют существенное значение для раскрытия процессов развития устойчивости клеток опухоли к воздействию ионизирующих излучений. Широко используемые в настоящее время методы стереотаксической лучевой терапии, где используются высокие дозы облучения за короткое время и малое количество фракций (до 5), а в радиохирургии однократное облучение, диктуют необходимость изучения формирующихся эффектов в опухолевых клетках при действии больших доз ионизирующего излучения. Особенно это касается вопросов радиоустойчивости, миграционной способности,

выживаемости клеток опухоли. Анализ молекулярно-генетических и клеточных изменений, лежащих в основе формирования устойчивости к радиационному фактору, позволит оптимизировать текущие схемы терапии онкологических пациентов и снизить риск возникновения рецидивов. Значимость полученных результатов для клинической практики заключается в возможности подбора режимов облучения, тем самым повышая эффективность лечения. Эти данные также открывают перспективы для создания принципиально новых методов терапии, направленных на предотвращение рецидивов злокачественных новообразований, а также способствовать обнаружению перспективных лекарственных препаратов, которые смогут модифицировать радиорезистентность опухолевых клеток.

Результаты диссертационного исследования были внедрены в работу отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, а также в образовательный процесс кафедры медицинской физики Инженерно-физического института биомедицины Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ».

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием уже ранее отработанных методик исследований, которые были описаны как в отечественных, так и в зарубежных работах в области радиационной физики, радиобиологии и молекулярно-клеточной биологии.

В работе применялись следующие методики:

- Культивирование опухолевых клеток человека;
- Иммуноцитохимическое окрашивание опухолевых клеток для количественной оценки остаточных фокусов ДР ДНК, а также их пролиферативной активности и определения стадий клеточного цикла;
- Микроядерный тест для оценки цитогенетических нарушений;
- Клоногенный тест для оценки репродуктивной гибели клеток;

- Тест на заживление «раны» или «скрэтч-тест» для определения пролиферативной и миграционной активности опухолевых клеток;
- Полученные данные были обработаны с использованием различных статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. У выживших после острого облучения клеток карциномы легкого человека, карциномы шейки матки и p53-дефицитных клеток немелкоклеточного рака легкого значительно увеличивается время удвоения клеточной популяции за счет остановки в сверхочных точках клеточного цикла (линии A549 и HeLa) и гибели клеток (линия p53-дефицитных H1299).

2. Выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки HeLa, по сравнению с предварительно необлученными, имели значительно меньшее количество остаточных фокусов репарации ДР ДНК и количество микроядер как без дополнительного воздействия, так и после рентгеновского облучения в дозах 5 и 10 Гр. Аналогичные результаты получены для клеток A549, однако достоверно низкие показатели по количеству остаточных фокусов репарации ДР ДНК фиксировали после облучения в дозе 10 Гр.

3. Клоногенный тест выявил более высокую устойчивость выживших после острого облучения в дозе 15 Гр опухолевых клеток A549RR, HeLaRR и H1299RR к дополнительному воздействию рентгеновского излучения в дозах 2, 4 и 6 Гр. Наиболее высокую выживаемость отмечали у p53-дефицитных клеток H1299RR.

4. Выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки аденокарциномы шейки матки человека HeLaRR проявляют более высокую миграционную активность по сравнению с исходными клетками после дополнительного облучения в дозах 2 и 4 Гр, однако облучение в дозе 6 Гр эту активность значительно подавляет, что важно при планировании стратегии лучевой терапии.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Результаты диссертационной работы Цишнатти А.А. «Особенности опухолевых клеток человека, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения» соответствуют паспорту специальности 1.5.1 – Радиобиология, в частности к пунктам 1. «Взаимодействие различных видов ионизирующих излучений с веществом. Прямое и косвенное действие ионизирующих излучений на биологические объекты. Медико-биологические последствия действия радиации и разработка методов их минимизации. Стохастические и не стохастические эффекты; зависимости: доза-эффект и время-эффект»; п. 3 «Физико-химические и молекулярные механизмы первичных и начальных процессов лучевых нарушений, протекающих с момента возникновения ионизированных и возбужденных атомов и молекул до появления структурных и функциональных изменений в организме. Физические и биологические основы действия ионизирующего излучения. Острое и хроническое действие радиации»; п. 4 «Механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками»; п. 5 «Молекулярная радиобиология. Механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК, РНК, белки и клеточные мембраны; молекулярные механизмы репарации лучевых повреждений; механизмы радиационного гормезиса»; п. 6 «Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток».

Достоверность результатов исследований

Для оценки достоверности полученных результатов применялись современные статистические методы с использованием специализированного программного обеспечения. Статистический анализ проводился с помощью следующих программных пакетов: Microsoft Excel 2019, OriginPro 8.5, Statistica 10.0.

При обработке количественных данных использовались:

1. t-критерий Стьюдента для независимых выборок
2. U-критерий Манна-Уитни
3. Критерий Колмогорова-Смирнова

Результаты представлены в формате $M \pm m$, где:

M – среднее арифметическое значение выборки
 m – стандартная ошибка среднего

Статистически значимыми считались различия при уровне значимости $p \leq 0,05$, что соответствует общепринятым стандартам в радиобиологических исследованиях. Результаты исследования были соотнесены с имеющимися научными данными, а их достоверность подтверждена благодаря широкому обсуждению в научном сообществе через публикации и выступления на научных семинарах, конференциях и т.п.

Апробация работы

Все материалы и полученные результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных конференциях:

- 1) VIII съезд по радиационным исследованиям. Москва, 2021 г.;
- 2) 4 Международный Симпозиум и международная школа молодых ученых, «Физика, инженерия и технологии для биомедицины», НИЯУ МИФИ. Москва, 2019 г.;
- 3) 3-я Российская конференция с международным участием в Дубне, «Радиобиологические основы лучевой терапии» 2019 г.;
- 4) Сборник трудов школы-конференции молодых ученых с международным участием, «Ильинские чтения». Москва, 2019 г.

Апробация диссертации проведена на заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Публикации

По итогам исследования опубликован цикл из 9 научных работ. Его основные результаты представлены в 5 статьях в авторитетных рецензируемых журналах, индексируемых международными базами данных и входящих в перечень ВАК, а также в 4 тезисах докладов. Публикации в таких изданиях служат подтверждением соответствия работы современным критериям научной значимости.

Личный вклад автора

Автор лично осуществлял ключевые этапы исследований, включая: планирование и проведение экспериментальных работ; получение и обработку первичных данных; статистический анализ результатов и их интерпретацию. Преобладающее большинство представленных в работе экспериментальных результатов являются результатом личных усилий автора.

Структура диссертации

Диссертационная работа объемом 122 страница представляет собой комплексное исследование, включающее теоретический анализ литературных данных и оригинальные экспериментальные результаты. Материал систематизирован в традиционные разделы: введение, обзор литературы, описание методологии, представление полученных данных и их интерпретацию, а также заключение и выводы. Научная работа содержит 30 иллюстраций и 2 таблицы, визуализирующих ключевые результаты. Библиографическая база исследования включает 156 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гетерогенность опухолевых клеток и радиочувствительность

Злокачественные новообразования являются сложными и гетерогенными клеточными структурами, характеризующиеся накоплением генетических изменений, приводящих к неконтролируемому росту и пролиферации клеток. Эволюционная динамика играет решающую роль в возникновении и развитии злокачественных опухолей, формируя гетерогенность и адаптивность опухолевых клеток к различным воздействиям [4, 11, 13, 14]. С точки зрения теории эволюции опухоли представляют собой сложные экосистемы, которые развиваются в процессе микроэволюции под воздействием генетических мутаций, эпигенетических изменений и факторов микроокружения опухолей. Такая динамичная природа опухолей создает значительные проблемы при разработке эффективного лечения и ее понимание необходимо для разработки эффективных и персонализированных методов лечения. Раскрывая механизмы, определяющие гетерогенность опухоли, исследователи пытаются выявить ключевые генетические и эпигенетические изменения, которые способствуют прогрессированию опухоли и ее устойчивости к лечению [5, 10].

Популяции опухолевых клеток демонстрируют заметную изменчивость почти по всем заметным фенотипическим признакам, включая клинически важные фенотипы, такие как способность давать метастазы и выживать после терапии. Такое фенотипическое разнообразие является результатом интеграции как генетических, так и негенетических влияний. Последние технологические достижения улучшили молекулярное понимание раковых заболеваний и определение мишеней для терапевтических вмешательств. Однако, стало совершенно очевидно, что полезность профилей, основанных на анализе массовых опухолей, ограничена внутриопухолевой генетической и эпигенетической гетерогенностью, поскольку характеристики наиболее

распространенного типа клеток не обязательно могут предсказывать свойства смешанных популяций.

В то время как фенотипическая гетерогенность клеток внутри опухолей отмечалась с самых первых дней развития биологии рака, экспериментальное изучение этого вопроса было ограничено отсутствием концептуальной основы и инструментов исследования. Ситуация изменилась с открытием того, что образование опухолей зависит от приобретения онкогенных мутаций, и с осознанием того, что раковые образования возникают в результате клональной эволюции, подобной дарвиновской [4]. Эти результаты подчеркнули развитие геноцентрической перспективы, в которой существование гетерогенности по клинически важным признакам приписывалось генетическому разнообразию, возникшему в результате клональной эволюции [10]. Обоснованность этой точки зрения была подтверждена недавними общегеномными исследованиями с высоким разрешением, которые выявили поразительную генетическую гетерогенность внутри отдельных видов рака, включая популяционное разнообразие мутаций, затрагивающих предполагаемые локусы-драйверы [11, 12]. Однако, доминирование геноцентрических взглядов было оспорено быстрым развитием исследований в рамках гипотезы опухолевых стволовых клеток (ОСК), которая утверждает, что различия между функционально важными свойствами отдельных опухолевых клеток возникают из-за различий в их статусе дифференцировки, таким образом, привлекая внимание к негенетическим источникам фенотипической изменчивости.

Таким образом, концепции клональной эволюции и ОСК представляют собой основы для интерпретации причин фенотипической гетерогенности [13, 14]. Очевидно, что эти две концепции не являются взаимоисключающими, о чем свидетельствуют недавние сообщения о существенной внутриопухолевой генетической гетерогенности в популяциях, предполагаемых ОСК [15, 16]. Более того, негенетические источники фенотипической гетерогенности не ограничиваются различиями, которые могут быть сопоставлены с иерархиями дифференцировки, а шум в экспрессии генов приводит к существенной

межклеточной вариабельности в кажущихся фенотипически однородными субпопуляциях.

Очевидно, что не каждое генетическое различие между клетками опухоли приводит к различиям в фенотипе, и только ограниченное количество этих фенотипических различий имеет отношение к клинически важным признакам. Однако, учитывая сообщения о внутриопухолевой гетерогенности в локусах [11, 12], вовлеченных в терапевтическую радиорезистентность [17], ожидается, что генотипическое разнообразие приведет к гетерогенности клинически значимых наследуемых фенотипов. В дополнение к прямым фенотипическим проявлениям, накопление большого количества мутаций-пассажира может влиять на клеточные фенотипы более тонкими способами. Кроме того, поскольку опухолевые клетки накапливают большое количество генетических мутаций, то следует обратить внимание на возможные генетические взаимодействия между этими мутациями [18].

Негенетическая гетерогенность в нормальных тканях. Негенетическую гетерогенность фенотипов можно разделить на два типа: детерминированную и случайную. Детерминированная гетерогенность в нормальных тканях соответствует гетерогенности клеточного фенотипа, который может быть отображен в тканеспецифическую иерархию дифференцировки. Однако, из-за стохастической гетерогенности клеточные фенотипы в пределах заданных детерминированных состояний не являются статичными, поскольку исследование отдельных клеток в популяциях неизбежно выявляет существенную межклеточную изменчивость, обусловленную стохастическим характером биохимических процессов внутри клеток [19].

Иерархия дифференцировки при опухолевых заболеваниях. Бум исследований ОСК продвинул перспективу ОСК в качестве доминирующей основы для рассмотрения негенетических источников фенотипической гетерогенности клеток в опухолях [14]. Согласно этой парадигме, фенотипическая гетерогенность при раковых заболеваниях является отражением иерархий дифференцировки, существующих в нормальных тканях. Действительно,

фенотипическая гетерогенность, которая может быть сопоставлена с различными состояниями дифференцировки, по-видимому, доминирует над эффектами онкогенных трансформаций, поскольку профили экспрессии генов, более дифференцированных и похожих на стволовые клетки субпопуляций при раке молочной железы, группируются более близко к своим аналогам в нормальных тканях, чем друг к другу [16, 20].

Более того, фенотипическая гетерогенность, которая подчеркивается состояниями дифференцировки, была связана с критически важными клиническими результатами, такими как прогноз, резистентность к радиотерапии и способность к образованию метастазов [21]. В целом, более высокая экспрессия маркеров стволовых клеток, предположительно отражающая более высокую частоту встречаемости этих клеток в опухолях, связана с худшим клиническим исходом, что приводит к общепринятой интерпретации, согласно которой ОСК более устойчивы к радиотерапии и способны к формированию метастазов. Однако, альтернативные объяснения включают большие эффективные размеры популяции, которые увеличивают вероятность генетической и негенетической изменчивости независимо от "стволовости".

Молекулярные механизмы устойчивости к радиотерапии. В литературе хорошо описано несколько ключевых механизмов, которые вызывают устойчивость опухолевой ткани к лучевой терапии, включая восстановление от радиационно-индуцированных повреждений ДНК, остановку клеточного цикла, активацию антиапоптозных путей, присутствие ОСК, фенотипические изменения в опухолевых клетках и их микроокружения [22]. Основным фактором радиационно-индуцированной гибели клеток выступают структурные нарушения ДНК. При взаимодействии ионизирующего излучения с генетическим материалом клетки происходит энергетическая дестабилизация молекулы, приводящая к множественным повреждениям различного типа. Наибольшую значимость представляют ДР ДНК, однако параллельно наблюдаются: одонитевые разрывы, модификации азотистых оснований и нарушения межнуклеотидных связей и т. п. [23]. Ключевыми механизмами репарации ДР ДНК являются негомологичное

воссоединение концов и гомологичная рекомбинация. Сигнальные пути в сверхочных точках клеточного цикла реагируют на повреждения ДНК задержкой начала митоза и дают больше времени для восстановления ДНК [24]. Приобретение опухолевыми клетками устойчивости к облучению в ходе их развития, вызванное интеграцией множественных молекулярных сигналов, может являться причиной частых рецидивов. Одной из ключевых задач является понимание механизмов активации и реализации путей восстановления от повреждений ДНК, что будет иметь, в конечном итоге, решающее значение для поиска путей блокировки восстановления ДНК опухолевых клеток и, следовательно, индукции некроза и апоптоза в них. Важным подходом для повышения эффективности терапии опухолей является воздействие на ключевые регуляторы путей ответа на повреждения ДНК опухолевых клеток и снижение их резистентности к лучевой терапии путем разрушения регуляторной системы.

Одним из ключевых механизмов формирования радиорезистентности опухолевых клеток является задержка клеточного цикла. Ионизирующее излучение индуцирует в опухолевых клетках повреждения ДНК, в частности ДР ДНК, которые служат сигналом для остановки клеточного цикла. Эта остановка позволяет клеткам активировать механизмы репарации и избежать накопления дополнительных повреждений при дальнейшем воздействии излучения, что способствует развитию устойчивости к лучевой терапии [25]. Важную роль в этом процессе играет белок p53 – ключевой регулятор G1/S-контрольной точки клеточного цикла. В нормальных клетках белок p53 играет ключевую роль в реализации защитного механизма при повреждении ДНК. Он опосредует остановку клеточного цикла в G1-фазе, предотвращая переход в S-фазу цикла, связанного с синтезом ДНК, что дает время на репарацию от повреждений. Однако в опухолевых клетках эта функция часто нарушена из-за мутаций в гене TP53. В результате регуляторы G1/S-контрольной точки инактивируются, позволяя поврежденным клеткам беспрепятственно вступать в S-фазу. Согласно современным данным, лучевая терапия индуцирует экспрессию активируемой каспазой ДНКазы (CAD), что вызывает остановку клеточного цикла в G2-фазе.

Эта задержка позволяет клеткам выявлять повреждения ДНК. Подавление экспрессии CAD повышает радиочувствительность клеток [26]. Следовательно, направленное воздействие на G2-контрольную точку представляет собой перспективную стратегию для повышения эффективности лучевой терапии. Полагают, что активируемая каспазой ДНКаза (CAD) есть нуклеаза, вызывающая *de novo* повреждения ДНК в определенных локусах, которые находятся вблизи участков модифицирующего хроматин фактора связывания CCCTC (CTCF). Активность нуклеазы CAD регулируется фосфорилированием киназ в ответ на повреждение ДНК, независимо от активности каспазы. В свою очередь, потеря активности CAD нарушает механизмы, влияющие на выживаемость клеток, делая опухолевые клетки более уязвимыми для ДР ДНК, вызванных излучением. В результате происходит остановка клеточного цикла в G2-фазе, что создает временное окно для восстановления радиационных повреждений ДНК. Проведенные исследования демонстрируют, что подавление активности CAD (каспаза-активируемой ДНКазы) приводит к значительному повышению радиочувствительности клеток [27]. Возможность модификации контрольной точки цикла в фазе G2 может стать потенциальным способом повышения эффективности лучевой терапии.

Нарушение в инициации гибели клеток по пути апоптоза является важной способностью опухолевых клеток при выживании после радиационно-индуцированных повреждений. Опухолевые клетки обладают целым комплексом молекулярных механизмов, способствующих выживанию, их устойчивости к лучевой терапии и предотвращению апоптоза. Одним из ключевых путей является ингибирование запрограммированной клеточной гибели через регуляцию сигнального каскада Bcl [28, 29]. Повышение уровня антиапоптотических белков, таких как Bcl-2 и Bcl-XL, подавление или инактивация проапоптотических белков, таких как Bax и Bak, представляют собой некоторые пути, позволяющие избежать апоптоза и повысить устойчивость к облучению. Было показано, что воздействие на важные регуляторы семейства белков Bcl-2 позволяет преодолеть устойчивость опухолевых клеток к апоптозу для некоторых типов

злокачественных новообразований, что было описано в качестве метода радиосенсибилизации [30].

Микроокружение опухоли, образованное внеклеточным матриксом и сигнальными молекулами в условиях гипоксии и ацидоза, играет критическую роль в прогрессии опухоли и развитии устойчивости к терапии [31, 32]. Под действием ионизирующего излучения в нем возникают многочисленные патологические процессы, среди которых выделяются хроническое воспаление, фиброз и угнетение иммунного ответа. Данные изменения носят комплексный характер и существенно влияют на эффективность радиотерапии.

Роль экзосом в радиорезистентности опухолевых клеток. Ряд исследований показывает, что радиорезистентные клетки могут воздействовать на обычные клетки через экзосомы и вызывать у реципиентов изменения, способствующие приобретению радиорезистентных характеристик. В исследовании [33] провели оценку результатов лечения пациентов с плоскоклеточным раком головы и шеи, получавших химиолучевую терапию (ХЛТ). Скрининг экзосом из объединенных образцов плазмы пациентов, у которых был полный или неполный ответ на ХЛТ показал отличительный паттерн экспрессии белков у пациентов, у которых был полный ответ, и у тех, у кого его не было. Эти результаты указывают на то, что радио- и химиорезистентные клетки формируют экзосомы с характерным набором молекул. Дальнейшие исследования показали, что ключевыми игроками в радиочувствительности, опосредованной экзосомами, являются экзосомальные некодирующие РНК, белки и баланс между путями выживания и апоптоза. В исследовании [34] авторы с использованием количественной ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени обнаружили, что кольцевая ATR8B4 из экзосом радиорезистентных клеток глиомы переносится в необлученные клетки и способствует формированию радиорезистентности клеток. При этом она действует как губка, впитывающая микроРНК (miR)-766, т. е. ингибируя действие микроРНК, и, таким образом, оказывает влияние на транскрипцию. В исследовании [35] было показано, что экзосомы, выделенные из облученных клеток плоскоклеточного рака головы и шеи, передают сигналы, которые могут

способствовать выживанию клеток-реципиентов. При изучении рака молочной железы обнаружено, что экзосомальные РНК опосредуют развитие радиорезистентности через активацию противовирусного пути STAT1/NOTCH3 [36]. Кроме того, в случае немелкоклеточного рака легкого радиационно-индуцированная экзосомальная miR-208a способствует усилению пролиферации и повышению радиорезистентности путем ингибирования p21 с последующей активацией сигнального пути АКТ/mTOR [37]. В исследовании [38] было обнаружено, что экзосомы могут повышать выживаемость клеток при радиационном воздействии за счет увеличения уровней онкогенных miРНК, мРНК и белков путей выживания и в то же время снижения уровней опухолесупрессирующих miРНК и мРНК. Недавно было обнаружено, что другие экзосомальные некодирующие РНК также участвуют в повышении радиорезистентности, такие как длинная некодирующая РНК ANIF при глиобластоме и кольцевая ATR8B4 при глиоме [34, 39].

Секреция факторов, опосредующих радиорезистентность, в межклеточную жидкость и кровь привлекает внимание к ее диагностическому потенциалу. Высокостабильные кандидаты микроРНК, обнаруженные в крови, были предложены в нескольких исследованиях в качестве прогностических маркеров радиорезистентности. Однако, для подтверждения их полезности необходимы клинические исследования [40]. Возможность прогнозировать ответ на лечение с помощью базы данных статуса радиорезистентности микроРНК поможет в выборе эффективной терапевтической стратегии. Возможность терапии на основе микроРНК в настоящее время изучается в ходе продолжающихся клинических исследований, и такие подходы могут быть использованы для снижения резистентности у онкологических пациентов.

В обзоре [41] были описаны эффекты действия онкосом, опосредующие радиорезистентность, предприняты попытки ингибирования их секреции, биогенеза или поглощения другими клетками. Это привело к сенситизации опухоли и более высокой противоопухолевой эффективности в многочисленных исследованиях *in vitro*. Введение ингибиторов экзосом гепарина и симвастатина

может помочь смягчить последствия инъекции онкосом, полученных из радиорезистентных клеток у мышей [38, 42]. После открытия секреторных регуляторных факторов РНК, передающих радиорезистентность, были предложены подходы к их усилению или подавлению *in vivo*. Ингибирование паракринного фактора PAI-1 у мышей с раком легких пероральным введением типлакстинина успешно сенсibilizировало опухоли к лучевой терапии и приводило к значительному уменьшению объема опухоли [43].

Такие подходы открывают путь к подавлению подмножества радиорезистентных опухолевых клеток посредством поглощения секретируемых факторов. Однако остается открытым вопрос, как уничтожить радиорезистентные опухолевые клетки и ОСК, которые также присутствуют в этой модели как субпопуляция в гетерогенной опухоли. В настоящее время основные направления исследований в области таргетной терапии ОСК включают иммунотерапию, ингибирование ключевых сигнальных путей, ингибирование репарации ДНК и активацию покоящихся ОСК [44, 45]. Исследования дифференциальной экспрессии внутриклеточной микроРНК между радиорезистентными и радиочувствительными опухолевыми клетками указывают на контроль микроРНК над ответом опухолевых клеток на лучевую терапию, и ее прямые манипуляции могут быть использованы для сенсibilизации опухоли перед терапией.

1.2. Молекулярно-клеточные механизмы радиорезистентности опухолевых клеток

Злокачественные новообразования представляют собой одну из наиболее значимых медико-социальных проблем современного здравоохранения. В клинической практике для лечения применяются такие основные методы, как хирургическое вмешательство (радикальное или паллиативное), химиотерапия (включая различные схемы противоопухолевых препаратов), лучевая терапия (дистанционная, контактная или радионуклидная), иммунотерапия (в том числе ингибиторы контрольных точек клеточного цикла), таргетная терапия (молекулярно-направленное лечение).

Данные подходы могут использоваться как в виде монотерапии, так и в различных комбинациях, в зависимости от конкретной клинической ситуации и характеристик опухоли. Поскольку опухолевые клетки чувствительны к ионизирующему излучению, лучевая терапия стала основным видом лечения злокачественных новообразований [46, 47, 48]. Она непосредственно индуцирует повреждение ДНК или косвенно индуцирует продукты активных форм кислорода (АФК) в раковых клетках. Кроме того, лучевая терапия в сочетании с иммунотерапией и химиотерапией может обратить вспять гипоксию опухоли за счет снижения потребления ею кислорода и изменить иммунный ответ к опухоли, что может привести к значительным клиническим улучшениям при многих типах опухолей. Лучевая терапия имеет преимущество локализованного применения, но было показано, что она активирует несколько факторов транскрипции эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), включая SNAIL, HIF1 (гипоксический индуцибельный фактор 1), ZEB1 и STAT3, способствуя метастазированию раковых клеток [49]. Радиорезистентность негативно сказывается на лечении больных с онкологией и является основной причиной неудач в лучевой терапии, что, в конечном итоге, может привести в дальнейшем к рецидиву опухоли и метастазам.

Злокачественные новообразования тесно связаны с нарушением обмена веществ. Метаболическое перепрограммирование, изменение метаболических путей в опухолевых клетках в ответ на гипоксию или недостаток питания, является отличительным признаком злокачественных новообразований. Аберрантная активация онкогенов и связанных с опухолью сигнальных путей может индуцировать метаболическое перепрограммирование клеток рака предстательной железы или молочной железы, продуцируя специфические метаболические отпечатки [50, 51]. Кроме того, инактивация генов-супрессоров опухоли является важным фактором, лежащим в основе метаболических изменений опухоли [52]. Напротив, метаболические изменения также могут способствовать развитию и прогрессированию злокачественных новообразований. Кроме того, многие исследования подтвердили, что метаболический синдром,

включающий ожирение, сердечно – сосудистые заболевания и сахарный диабет, оказывают глубокое влияние на возникновение и развитие злокачественных новообразований [53, 54, 55, 56].

Метаболические изменения также могут индуцировать радиорезистентность. Было показано, что изменения в гликолитическом метаболизме способствуют развитию радиорезистентности. Результаты лучевой терапии в первую очередь зависят от метаболизма глюкозы, в тоже время и митохондриальные метаболические изменения также могут быть вовлечены в этот процесс. Комплексный анализ метаболических путей у больных онкологией, прошедших лучевую терапию, выявил повышенную экспрессию генов, регулирующих функции митохондрий, аутофагию и активность лизосомальной деградации, а также сильную зависимость от митохондриального дыхания и уменьшение зависимости от эффекта Варбурга. Также было продемонстрировано, что CDK1 опосредует активацию Sirtuin 3 (SIRT3), регулирует митохондриальное деацетилирование белка, тем самым способствуя метаболическому балансу, и усиливает митохондриальные функции, индуцируя антирадиационные эффекты в клетках толстой кишки, глиомы и рака молочной железы [57].

Лучевая терапия опухолей – это высокоточный и эффективный метод лечения опухолевых клеток, который может привести к выздоровлению или паллиативному лечению. Ионизирующее излучение индуцирует в опухолевых клетках окислительный стресс. Образующиеся при этом свободные радикалы вызывают основные типы радиационных повреждений ДНК, такие как одно- и двунитевые разрывы. Нарушение целостности генетического материала в конечном счете приводит к гибели клетки [58]. Помимо ДНК, ионизирующее излучение может воздействовать на плазматические мембраны и субклеточные органеллы, а также вызывать активацию генов, связанных со стрессорным ответом клетки и внутриклеточными сигнальными путями, вызывая гибель клетки. Кроме того, облученные клетки могут влиять на своих необлученных соседей через эффект свидетеля или передачу апоптотических сигналов окружающим необлученным клеткам через прямой клеточный контакт или

межклеточную связь, что приводит к тому, что необлученные клетки также проявляют аналогичные биологические эффекты [59]. В совокупности эти эффекты приводят к повреждению ДНК, хромосомной нестабильности, мутациям и апоптозу в опухолевых клетках, что в итоге приводит к их гибели.

Радиорезистентность представляет собой сложный биологический феномен, при котором злокачественные клетки приобретают устойчивость к воздействию ионизирующего излучения в ходе лучевой терапии. Данный процесс характеризуется: многофакторностью механизмов, молекулярными особенностями и сопровождается клиническими проявлениями (рис. 1).



Рисунок 1 – Основные изменения и механизмы, лежащие в основе формирования устойчивости к облучению в опухолевых клетках

Механизмы формирования радиорезистентности являются очень актуальным вопросом для многих ученых, и было показано, что основными факторами, участвующими в этом процессе, являются следующие:

1. Восстановление повреждений ДНК. Воздействие ионизирующего излучения на опухолевые клетки приводит к активации ключевых сигнальных каскадов, ответственных за репарацию ДНК. Среди них наиболее значимыми являются: путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), сигнальный каскад митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), сиртуин-зависимый (SIRT) механизм восстановления. Эти системы обеспечивают быстрый клеточный ответ

на радиационные повреждения генетического материала, инициируя процессы восстановления ДНК [60, 61]. Фосфатидилинозитол 3-киназа регулирует уровни гомологичной рекомбинации в стационарном состоянии, способствуя репарации повреждений ДНК, а ингибитор PI3K PI-103 может значительно усиливать радиационно-индуцированную гибель. MAPK является посредником в клеточных стресс-реакциях, участвует в фосфорилировании XRCC1 и регуляции реакции окислительного стресса, также способствуя репарации повреждений [62]. Кроме того, SIRT представляет собой класс гистоновых деацетилаз, а подавление SIRT1 способствует гибели клеток за счет снижения уровня ферментов репарации ДНК, включая MSH2, MSH6 и APEX1 [63].

2. Остановка клеточного цикла. При выявлении повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением, ключевые регуляторные белки контрольных точек клеточного цикла активируют механизмы его временной остановки. Кроме того, опухолевые клетки могут использовать два различных киназных сигнальных каскада для репарации повреждений ДНК.

3. Изменения онкогена и опухолевого супрессора. Например, молекула клеточной адгезии витронектина (VTN) является важным онкогеном, а нарушение регуляции его экспрессии способствует миграции и инвазии карциномы носоглотки (NPC), а также радиорезистентности клеток NPC при радиотерапии [64]. Кроме того, многие микроРНК играют роль опухолевого супрессора, и изменение их экспрессии в клетках рака легких и молочной железы представляет собой важную причину радиорезистентности.

4. Изменения в микроокружении опухоли (МО) могут привести к развитию радиорезистентности. Многие иммуносупрессивные процессы повышают риск рецидива опухоли и метастазирования, а низкий уровень иммунного ответа становится серьезным препятствием в лечении рака. Изменение уровня цитокинов, связанных с ЭМП процессов и гипоксических состояний может способствовать развитию радиорезистентности в опухолевых клетках [65].

5. Аутофагия – процесс, при котором клетка уничтожает поврежденные белки или целые органеллы [66]. Нарушение этого процесса может

способствовать развитию системных аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка, в то время как при канцерогенезе может стимулировать или подавлять выживание и пролиферацию опухолевых клеток. Во многих случаях аутофагия препятствует запуску апоптоза, однако при чрезмерной активации может его и запустить. Таким образом, в случае блокировки апоптоза, аутофагия может выступить в качестве индуктора радиорезистентности в опухолевых клетках. Стресс-усиление аутофагии и последующая индукция апоптоза, наоборот, является своего рода сенситизатором к действию повреждающих факторов. В связи с этим, таргетная аутофагия может быть эффективным способом улучшения эффектов лучевой терапии [67].

6. Совокупность ОСК может представлять собой основу резистентности к радиотерапии. ОСК представляют собой недифференцированную популяцию злокачественных клеток, характеризующуюся выраженной онкогенной активностью, способностью к самовозобновлению, мультипотентностью дифференцировки [68]. Эти клетки демонстрируют повышенную онкогенную активность и играют критическую роль в рецидивировании опухоли благодаря их присущей резистентности к стандартным методам терапии, включая химио- и лучевое воздействие, а также выраженной способности к метастазированию. Кроме того, эти клетки отвечают за развитие гетерогенности опухолевых клеток, что является ключевым фактором радиорезистентности к противоопухолевой терапии, подробно это будет рассмотрено ниже. Стволовые клетки глиомы находятся в контакте с эндотелиальными клетками в периваскулярной ячейке и проявляют признаки лучевой резистентности [69].

Метаболизм опухоли. Все большее число исследований демонстрируют, что радиорезистентность тесно связана с изменениями метаболизма опухоли. Основным клиническим ограничением лучевой терапии выступает развитие клеточной радиорезистентности, механизм возникновения и развития которой связан с адаптивными метаболическими перестройками, включая активацию гликолиза и модификацию митохондриальных функций.

Таргетирование клеточного метаболизма глюкозы или митохондрий может улучшить клинический ответ на радиотерапию.

Существует несколько молекулярных механизмов, формирующих клеточную радиорезистентность.

Метаболизм глюкозы. В 1920-х годах Варбург продемонстрировал, что даже при наличии необходимого количества кислорода раковые клетки могут иметь активные гликолитические фенотипы. Этот аэробный гликолиз известен как эффект Варбурга, характеризующийся повышенной скоростью поглощения глюкозы, активным гликолизом и высоким содержанием молочной кислоты. Кроме того, синтез NADPH в раковых клетках индуцируется через пентозофосфатный путь (ПФП) и снижение уровня окислительного фосфорилирования в митохондриях, тем самым уменьшая внутриклеточные уровни АФК и увеличивая зависимость опухоли от гликолиза. Активный гликолиз проявляет пролиферативные преимущества при соматическом канцерогенезе клеток, и он представляет собой важный компонент злокачественного фенотипа.

Метаболизм молочной кислоты. Молочная кислота является одним из основных продуктов гликолиза и одним из ключевых факторов в развитии злокачественных новообразований. Изменения метаболизма глюкозы после лучевой терапии могут приводить к накоплению большого количества молочной кислоты, которая является одним из уникальных фенотипов злокачественной опухоли. Многочисленные исследования свидетельствуют о значительном повышении концентрации лактата в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями [70]. Этот метаболический сдвиг ассоциирован с усилением метастатического потенциала, повышением частоты рецидивов и развитием радиорезистентности, что существенно ухудшает клинические исходы при различных злокачественных новообразованиях. Уровень лактата обладает прогностической ценностью, коррелируя с показателями метастазирования и общей выживаемости пациентов, а также служит биомаркером генотоксического стресса и гипоксия-опосредованной

радиорезистентности [71]. Экспериментальные данные на модели плоскоклеточного рака человека подтвердили прямую зависимость между накоплением молочной кислоты и снижением радиочувствительности опухолевых клеток [72]. Кроме того, установлено, что повышенный уровень лактата оказывает комплексное негативное воздействие на опухолевую стромальную среду, модулируя ангиогенные процессы через влияние на функциональную активность фибробластов и эндотелиальных клеток, что проявляется изменениями их пролиферативной активности, дифференцировки и процессов созревания [73].

HIF1 как важный посредник углеводного метаболического пути. Гипоксия в клетках часто оказывает негативное влияние на результаты лучевой терапии. Опухоли в большинстве случаев используют анаэробный гликолиз для получения энергии, в отличие от нормальных тканей. Злокачественные опухоли в зачатую гипоксичны, и они переходят на усиленный гликолиз для удовлетворения повышенного спроса на АТФ и биосинтетических предшественников. Гипоксические условия инициируют метаболическое репрограммирование опухолевых клеток, вызывая переход от окислительного фосфорилирования к анаэробному гликолизу. Этот адаптивный механизм не только обеспечивает клеточную защиту, но и способствует формированию радиорезистентного фенотипа, особенно в популяции опухолевых стволовых клеток. Экспериментальные исследования на клеточных линиях остеосаркомы человека продемонстрировали, что гипоксия обладает радиопротекторным действием, активируя процессы аутофагии через индукцию экспрессии ключевых маркеров LC3 и LC3-II, что способствует элиминации активных форм кислорода и развитию устойчивости к облучению [74]. Дальнейшие исследования выявили способность гипоксического микроокружения активировать экспрессию EGFR и NRF2 в клетках рака легкого, что коррелирует с повышением радиорезистентности. Этот процесс сопровождается активацией HIF1-зависимой транскрипционной программы, регулирующей клеточную адаптацию к условиям кислородного голодания. HIF1, являясь ключевым регулятором углеводного

обмена, опосредует метаболическое переключение с окислительного фосфорилирования на гликолиз. Молекулярная структура HIF1 включает кислород-чувствительную α -субъединицу (HIF1 α), содержащую кислород-зависимый домен деградации, и конститутивно экспрессируемую β -субъединицу (HIF1 β), что обеспечивает строгую кислород-зависимую регуляцию его активности. HIF1 β , известный ядерный транслокатор рецептора арилуглеводорода (ARNT), который не зависит от условий окружающей среды. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о ключевой роли HIF1 α в активации транскрипционной программы генов-мишеней, опосредующих фундаментальные клеточные процессы. Этот фактор транскрипции регулирует механизмы клеточной пролиферации, модулирует метаболические пути утилизации глюкозы и поддерживает кислотно-щелочной гомеостаз, что в совокупности обеспечивает эффективную адаптацию злокачественных клеток к условиям гипоксии [75].

Многочисленные исследования демонстрируют ключевую роль фактора HIF1 в прогрессировании злокачественных новообразований, включая процессы инвазии, метастазирования и формирования устойчивости к лучевой терапии [73]. Молекулярные механизмы HIF1-опосредованной радиорезистентности включают комплекс взаимосвязанных процессов.

HIF1 регулирует ангиогенез через активацию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), что способствует формированию радиорезистентного фенотипа в эндотелиальных клетках и стимулирует опухолевый рост. Одновременно HIF1 подавляет апоптотическую гибель клеток, воздействуя на регуляторный ген NDRG2, который снижает экспрессию проапоптотического белка BAX. Важно отметить, что HIF1 α может непосредственно модулировать p53-зависимый апоптоз, определяя тем самым радиочувствительность опухоли.

Активация сигнальных путей под действием HIF1 α представляет собой еще один важный механизм развития резистентности. Индукция хемокина CXCL8 и активация каскада АКТ/mTOR/STAT3 способствуют прогрессированию рака печени и его метастазов, параллельно формируя устойчивость к облучению. В

глиобластомах MEK/ERK-зависимая регуляция ДНК-протеинкиназы (DNA-PKcs) создает положительную обратную связь, усиливая экспрессию и активность HIF1.

Гипоксия-индуцированная аутофагия, регулируемая HIF1, играет существенную роль в радиорезистентности. В клетках рака молочной железы и толстой кишки HIF1 опосредует защитный ответ через активацию специфических молекулярных путей (HIF1/miR-210/BCL2), снижая радиационно-индуцированные повреждения ДНК. [76]. В легочных карциномах HIF1 α усиливает фосфорилирование c-JUN и экспрессию гена BECN1, что способствует выживанию клеток после облучения.

Вызванная гипоксией активация ОСК. Было установлено, что гипоксическое или перинекротическое микроокружение является благоприятным фактором для выживания и пролиферации других типов ОСК. Гипоксические клетки экспрессируют ОСК-маркеры, такие как CD44, CD133, OCT3/4 и SOX2 [77]. CD44 способствует фенотипу ОСК и устойчивости к радиации, и его изоформы, стандартная изоформа – CD44s и несколько других вариантов изоформы (CD44v), выполняют различные функции. После облучения экспрессия CD44s сильно повышается в зависимости от дозы, по сравнению с экспрессией CD44v, и способствует более длительной выживаемости клеток, поддерживая фосфорилирование ERK и радиационно-индуцированную ЭМП. Изоформа CD44v, образуемая в результате альтернативного сплайсинга под контролем регуляторных факторов ESRP1/2, играет важную роль в поддержании редокс-гомеостаза клеток посредством стабилизации мембранного цистеин-глутаматного антипортера xCT. Клинические наблюдения свидетельствуют о лучевой терапии-индуцированной эктопической экспрессии данной изоформы в опухолевых клетках пациентов с синдромом Ли-Фраумени, что может быть обусловлено наличием CD44v8-10-позитивной субпопуляции опухолевых стволовых клеток, генерирующих избыточные количества активных форм кислорода в ответ на радиационное воздействие и химиотерапевтическое лечение.

CD44 зарекомендовал себя как перспективный прогностический маркер радиочувствительности новообразований, при этом уровень его экспрессии

коррелирует с риском развития локальных рецидивов после лучевой терапии карцином гортани. В контексте рака поджелудочной железы CD44+CD24+ клеточная субпопуляция демонстрирует сниженный уровень апоптотической гибели и активных форм кислорода, что способствует формированию радиорезистентного фенотипа. При выявлении гиперэкспрессии CD44 в сочетании с интерлейкином-6 рекомендуется рассмотреть возможность радикальной цистэктомии.

Приобретение злокачественными клетками стволовых свойств под действием гипоксии, активирующей HIF1 α и HIF2 α , тесно связано с развитием радиорезистентности. Новые исследования показывают, что в глиомных стволовых клетках, локализованных в остеопонтин-обогащенных периваскулярных нишах, этот эффект реализуется через совместное действие HIF2 α и внутриклеточного домена CD44, продуцируемого γ -секретазой [78].

Современные исследования свидетельствуют о перспективности стратегий, направленных на подавление активности HIF1 α , что приводит к снижению антиоксидантного потенциала опухоли и модуляции ее микроокружения, тем самым повышая радиочувствительность злокачественных клеток. Комбинированный подход, объединяющий ингибирование HIF1 с лучевой терапией, демонстрирует значительный потенциал для улучшения клинических исходов.

Фармакологическое ингибирование HIF1 α с помощью таких соединений, как хетомин, нарушает его взаимодействие с коактиватором транскрипции p300, что существенно ослабляет гипоксия-индуцированную экспрессию генов. Этот механизм позволяет преодолевать радиорезистентность даже в условиях выраженной гипоксии. Дополнительным терапевтическим эффектом ингибирования HIF1 α является подавление экспрессии маркеров стволовости опухолевых клеток, что было продемонстрировано на моделях рака шейки матки.

Разнообразие механизмов действия существующих ингибиторов HIF1, воздействующих на различные сигнальные пути, открывает новые возможности для повышения эффективности лучевой терапии. Каждый из этих препаратов

обладает уникальным профилем влияния на молекулярные каскады, связанные с гипоксическим ответом, что позволяет подбирать оптимальные комбинации для различных типов злокачественных новообразований.

Другие молекулярные механизмы радиорезистентности. Пируваткиназа (ПК) может превращать фосфоенолпируват и АДФ в пируват и АТФ, что делает его одним из основных ферментов, ограничивающих скорость гликолиза. Экспериментальные данные подтверждают значимую корреляцию между уровнем экспрессии пируваткиназы и устойчивостью злокачественных клеток к лучевой терапии [79]. Особый интерес представляет изоформа М2 (PKM2), которая выполняет ключевую регуляторную функцию в процессе гликолиза и характеризуется специфической экспрессией исключительно в опухолевых клетках. Биологическая значимость PKM2 заключается в ее способности поддерживать клеточную жизнеспособность, индуцировать остановку клеточного цикла в фазе G2/M и модулировать апоптотические процессы. Кроме того, это может увеличить радиочувствительность немелкоклеточного рака легких вызванную ионизирующим излучением, скорость апоптоза и аутофагии, которые связаны с ингибированием АКТ и фосфорилированием PDK1. Экспериментальные данные свидетельствуют о существенном влиянии оксида азота (NO) на метаболические процессы в опухолевых клетках. Снижение внутриклеточной концентрации NO приводит к подавлению экспрессии PDK1 (пируватдегидрогеназкиназы 1), что сопровождается повышением радиочувствительности при немелкоклеточном раке легкого. Фармакологическое ингибирование PDK с помощью дихлорацетата демонстрирует значительный радиосенсибилизирующий эффект в клеточных моделях глиобластомы. Аналогичным образом, применение диизопропиламиновой соли дихлорацетата (DADA) существенно повышает чувствительность клеток плоскоклеточного рака пищевода к лучевому воздействию, что подтверждает перспективность метаболического подхода в радиомодифицирующей терапии.

Гексокиназа 2 (HK2) представляет собой критически важный фермент гликолитического пути, катализирующий начальный этап метаболизма глюкозы.

Его активация может вызывать гликолиз, и он играет важную роль в развитии и поддержании опухоли. Подавляя передачу сигналов НК2 в раковых клетках, их радиочувствительность может увеличиться. Дезокси-Д-глюкоза (2-DG), являясь также ингибитором гликолиза, эффективно подавляет энергетический метаболизм опухолевых клеток за счет снижения синтеза АТФ. Этот механизм лежит в основе способности 2-DG преодолевать радиационно-индуцированную резистентность. После фосфорилирования гексокиназой 2 (НК2), 2-DG нарушает процессы репарации ДНК, активируемые ионизирующим излучением, и индуцирует апоптотическую гибель клеток вследствие критического снижения внутриклеточного энергетического потенциала.

Клинически значимый синергический эффект наблюдается при комбинированном применении 2-DG с ингибиторами гистондеацетилаз, что приводит к усилению апоптотического ответа в клеточных моделях глиобластомы [80]. Дополнительным механизмом действия 2-DG является подавление экспрессии НК2, что еще более потенцирует его проапоптотическое действие.

Роль митохондрий в радиорезистентности. Митохондрии, являющиеся универсальными органеллами эукариотических клеток, играют ключевую роль не только в энергетическом метаболизме, но и в формировании устойчивости к лучевой терапии. Эти органеллы, выполняющие центральную функцию в процессах аэробного дыхания, демонстрируют значительную пластичность в условиях опухолевого роста, адаптируя свои биоэнергетические пути для удовлетворения повышенных метаболических потребностей злокачественных клеток.

Развитие радиорезистентности ассоциировано с комплексной реорганизацией митохондриального аппарата, включающей структурно-функциональные преобразования. Наблюдаемые изменения затрагивают морфометрические параметры органелл, особенности их энергетического метаболизма, а также сопровождаются накоплением мутаций митохондриальной ДНК. Важными факторами радиорезистентности выступают митохондриальный

мембранный потенциал и экспрессионный профиль белков, участвующих в энергетическом гомеостазе.

Особое значение в этом процессе принадлежит окислительно-восстановительному балансу, который определяется соотношением между генерацией активных форм кислорода и активностью антиоксидантных систем. Некомпенсированное накопление супероксидных радикалов приводит к развитию окислительного стресса, вызывающего структурные и функциональные повреждения митохондриального аппарата. Поддержание редокс-гомеостаза является критическим фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к лучевому воздействию.

Научные данные свидетельствуют, что сохранение функциональной целостности митохондрий при окислительном стрессе является важным фактором формирования устойчивости опухолевых клеток к лучевой терапии. Маус и др. в своей статье [81] продемонстрировали, что глиальный антиген NG2 (нейро/глиальный антиген 2) обеспечивает цитопротекторный эффект в клетках-предшественниках олигодендроцитов посредством взаимодействия с митохондриальной сериновой протеазой OMI/HtrA2, что предотвращает их гибель при окислительном повреждении. Пониженная регуляция NG2 может увеличить вероятность апоптоза и чувствительность клеток к окислительному стрессу. Напротив, повышенный митохондриальный окислительный стресс может способствовать улучшению радиочувствительности опухолевых клеток.

Механизмы, лежащие в основе реакции клеток на облучение, сложны, и они участвуют в торможении клеточной пролиферации и индукции апоптоза раковых клеток. Митохондриальные белки также участвуют в апоптозе, и поэтому они могут играть ключевую роль в передаче радиационного сигнала. Митохондриальные протеомы, полученные из лимфомы Беркитта, анализировались до и после облучения, и было идентифицировано 23 дифференциально экспрессированных белка [82]. Это говорит о том, что лучевая терапия может приводить к значительным изменениям в экспрессии митохондриальных белков и, следовательно, вызывать радиорезистентность.

1.3. Роль белка p53 в формировании радиорезистентности

Белок p53 отвечает за регуляцию старения клеток и переход клетки из одной стадии клеточного цикла в другую. Он может останавливать клеточный цикл в контрольных точках G1/S или G2/M с целью активации механизмов репарации ДНК в клетке [83].

В клетках млекопитающих p53-опосредованная остановка клеточного цикла обеспечивает важные функции контрольных точек. ДР ДНК при действии ионизирующего излучения активируют киназу с мутацией атаксии телеангиэктазии (ATM) и ингибируют активность лигазы MDM2 посредством фосфорилирования, вызывая быстрое накопление p53 и индукцию p21 [84, 114]. Одним из ключевых механизмов, с помощью которого белок p53 обеспечивает целостность хромосом, является задержка в G1 стадии клеточного цикла. Эта пауза в клеточном цикле позволяет устранить критические повреждения ДНК, такие как ДР, тем самым повышая шансы клетки на выживание. Помимо своей ключевой функции в регуляции контрольных точек клеточного цикла, белок p53 осуществляет комплексный контроль над экспрессией генов, ответственных за процессы гомологичной рекомбинации и репарации ДНК [85].

Белок p53 опосредует координированную регуляцию генов, контролирующих организацию гетерохроматина, что обеспечивает эффективное восстановление двунитевых разрывов ДНК. p53-нулевые клетки имеют дефекты в репарации двухцепочечных разрывов в гетерохроматине и имеют сниженную долговременную жизнеспособность после воздействия излучения [86].

Активация p53 в ответ на повреждение ДНК сопровождается индукцией множества генов-мишеней, кодирующих белки репарационных систем [85]. Хотя этот механизм не относится непосредственно к опухоль-супрессорной функции p53, он играет критическую роль в поддержании клеточной жизнеспособности. Среди ключевых генов-мишеней p53 следует отметить DDB2 и XPC, участвующие в эксцизионной репарации нуклеотидов [87, 88], а также RRM2B,

кодирующий рибонуклеотидредуктазу, которая обеспечивает синтез предшественников для репарации ДНК [89, 114].

Особый интерес представляет способность p53 активировать POLH, что приводит к рекрутированию специализированной ДНК-полимеразы, способной осуществлять точную репликацию поврежденной ДНК [90].

Белок p53 может регулировать внутриклеточные процессы самостоятельно или в результате взаимодействия с другими белками, находящимися внутри клетки.

Было показано [91], что в результате действия на клетку стрессовых факторов белок p53 проникает в митохондрии и активирует экспрессию проапоптотических генов, таких как Puma, Bax, Araf-1, Noxa, а также ингибирует экспрессию антиапоптотических генов, таких как гены семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-in, Mcl-1) [92].

Транскрипционный фактор p53 координирует транслокацию проапоптотических белков в митохондрии, что приводит к повышению проницаемости их наружной мембраны. Высвобождение цитохрома в цитоплазму служит сигналом к сборке апоптосомы – ключевого регулятора апоптоза. Этот высокомолекулярный комплекс образуется при взаимодействии цитохрома с белками Araf-1 и про-каспазой-9 [114]. Апоптосома вызывает активацию каспазы-9, что, в свою очередь, переводит профермент каспазы-3 в стадию активной протеазы, которая затем прикрепляется к группе эффекторных каспаз. Эти каспазы ответственны за лизис внутриклеточных белков, а также за характерные морфологические изменения апоптоза.

Помимо митохондриального пути, p53 опосредует апоптотический ответ через активацию генов, кодирующих ключевые компоненты внешнего пути апоптоза. К числу таких p53-регулируемых мишеней относятся рецепторы смерти FAS и TNF-суперсемейства (TNFRSF10A/DR4 и TNFRSF10B/DR5), которые играют критическую роль в инициации сигнальных каскадов программируемой клеточной гибели [93, 114].

p53 также активирует экспрессию аденозинового рецептора ADORA2B – рецептора-инициатора клеточной гибели, который сенситизирует клетки к апоптозу посредством внутреннего апоптотического пути – в ответ на повышение внеклеточного уровня аденозина, которое вызвано гипоксией (состоянием, обнаруживаемым у солидной опухоли) или химиотерапией [94].

В дополнение к уничтожению клеток *p53* также способствует постоянному ингибированию пролиферации посредством индукции старения и дифференцировки, которые представляют собой процессы, предотвращающие дальнейшую репликацию ДНК, но позволяющие клетке выживать и функционировать. Индуцированное *p53* старение может быть обнаружено в ответ на активацию онкогена или дисфункцию теломер [95, 96] и зависит от *p53*-опосредованной транскрипционной активации белка *p21*, который является ингибитором циклинзависимой киназы (CDK), которая останавливает клеточный цикл в фазе G1.

В эксперименте [97] на диплоидные фибробласты человека воздействовали H₂O₂ с возрастающими концентрациями. Результаты показали, что существуют сублетальные концентрации H₂O₂, способные вызывать остановку роста по типу старения, в то время как более высокие концентрации вызывали апоптоз. Они установили, что в условиях индуцированного апоптоза уровни *p53* были в два раза выше по сравнению с уровнями *p53* в условиях остановки роста. Было также показано, что порог интенсивности стресс-фактора на индукцию старения и апоптоза различается от типа к типу клеток [98]. Концентрация *p53* – не единственный параметр, определяющий его активность. Важную роль также играют альтернативный сплайсинг мРНК *p53* и посттрансляционные модификации белка *p53*. $\Delta 40p53$, $\Delta 133p53\alpha$ и $p53\beta$ представляют собой изоформы *p53*, в основном участвующие в клеточном старении, особенно на его ранних стадиях.

Транскрипционный фактор *p53* осуществляет комплексный контроль клеточного метаболизма через прямое регулирование ключевых метаболических генов. Одним из таких генов-мишеней является TIGAR, который модулирует

гликолитический поток путем гидролиза фруктозо-2,6-бисфосфата, тем самым подавляя характерный для опухолевых клеток эффект Варбурга [99, 100, 114].

Дополнительные метаболические пути находятся под контролем p53 через регуляцию таких ферментов, как фукозидаза FUCA1, участвующая в катаболизме фукозы [101], и глутаминаза GLS2, катализирующая превращение глутамина в глутамат [102, 114].

Особый интерес представляет PANK1 – ключевой регулятор биосинтеза кофермента А, экспрессия которого также контролируется p53 [103]. Белок PRKAB1, являясь мишенью для p53, кодирует субъединицу АМР-активируемой протеинкиназы бета-1. Она участвует в фосфорилировании и инактивации ацетил-кофермента. Карбоксилаза и β -гидрокси β -метилглутарил-коэнзим А редуктаза являются ключевыми ферментами, которые участвуют в регуляции биосинтеза жирных кислот и холестерина [104].

Являясь мишенью для p53, ген FDXR кодирует флавопротеин, локализованный в митохондриях. Основная функция этого белка заключается в переносе электронов от НАДФН к цитохромам P450, инициируя транспорт электронов в этой системе [105, 114].

Транскрипционный фактор p53 опосредует индукцию аутофагических процессов через активацию гена DRAM1, кодирующего ключевой лизосомальный мембранный белок, необходимый для реализации аутофагической программы [106, 114]. Дополнительно p53 активирует AMPK через прямое воздействие на PRKAB1, что приводит к ингибированию сигнального пути mTOR и последующей стимуляции аутофагии [107]. Альтернативный механизм подавления mTOR реализуется через p53-зависимую регуляцию экспрессии генов SESN1 и SESN2 [108].

Активация p53 в условиях клеточного стресса сопровождается выраженным подавлением белкового синтеза, что представляет собой важный механизм ингибирования клеточного роста. Этот эффект реализуется через комплексное воздействие на различные этапы биогенеза рибосом, включая транскрипционное подавление генов рибосомальной РНК [109] и ингибирование экспрессии генов,

ответственных за ядерно-цитоплазматический транспорт рибосомных белков [110]. Дополнительный уровень регуляции осуществляется через p53-зависимую активацию генов SESN1 и SESN2, которые опосредуют подавление mTOR-сигналинга, приводящее к глобальному снижению трансляционной активности [108, 114].

Транскрипционная активность p53 инициирует сложную сеть регуляторных петель обратной связи, модулирующих его собственный уровень и активность. Ключевым элементом этой системы является MDM2 – убиквитинлигаза, кодируемая геном-мишенью p53, которая обеспечивает деградацию p53 через убиквитин-протеасомный путь [111]. Этот процесс усиливается циклином G1 (CCNG1), другим p53-регулируемым геном, который способствует активации MDM2 посредством дефосфорилирования [112]. Белок p53 инициирует экспрессию фосфатазы PPM1D/WIP1, которая осуществляет отрицательную регуляцию сигнального пути путем дефосфорилирования p53 и ингибирование контрольных точек клеточного цикла [113, 114]. Эти взаимосвязанные механизмы формируют сбалансированную систему регуляции p53-зависимого ответа.

Белок p53 осуществляет комплексный контроль клеточного гомеостаза через регуляцию широкого спектра генов-мишеней, продукты которых интегрированы в ключевые биологические процессы. Его регуляторное влияние распространяется на поддержание геномной стабильности, координацию клеточного цикла, индукцию программируемой клеточной гибели, контроль процессов клеточного старения и метаболической адаптации. Дополнительно p53 участвует в модуляции аутофагических процессов, регуляции белкового синтеза и организации сложных систем обратной связи, что подчеркивает его центральную роль в поддержании клеточного гомеостаза.

Предполагаемые процессы, способствующие повышению устойчивости клеток к мультифракционированному облучению, включают такие клеточные ответы, как остановка в контрольных точках клеточного цикла с последующей активацией сигнальных путей, способствующих выживанию [115]. Кроме того, было показано, что радиорезистентность раковых клеток после многократных

фракций облучения может быть связана с индукцией ЭМП, который определяется как потеря характеристик эпителиальных клеток, таких как Е-кадгерин, и усиление характеристик мезенхимальных клеток, таких как N-кадгерин, виментин.

ЭМП представляет собой биологически значимый процесс, в рамках которого эпителиальные клетки претерпевают структурные изменения, приобретая характеристики мезенхимальных клеток, включая способность к миграции, инвазивности, модификации профилей экспрессии генов и метаболизм [116].

ЭМП III типа представляет собой наименее изученную форму клеточной трансдифференцировки, характерную для злокачественных новообразований. Данный процесс ассоциирован с фундаментальными изменениями биологических свойств опухолевых клеток, включая приобретение неограниченного пролиферативного потенциала и устойчивости к апоптотическим сигналам. Ключевыми особенностями ЭМП III типа являются выраженная геномная нестабильность, глубокая метаболическая репрограммировка, способность к уклонению от иммунного ответа и интенсификация ангиогенных процессов [117].

Злокачественные новообразования характеризуются выраженной инвазивной способностью и метастатическим потенциалом, что в значительной степени опосредовано активацией программы ЭМП. Многочисленные экспериментальные данные, полученные как *in vitro*, так и *in vivo*, подтверждают ключевую роль ЭМП в процессах инвазии и метастазирования при различных типах злокачественных опухолей [118, 119]. Приобретение мезенхимального фенотипа опухолевыми клетками сопровождается не только усилением их миграционного потенциала, но и развитием устойчивости к различным видам терапии, включая химиотерапевтические препараты, лучевое воздействие и иммунотерапию. Данный фенотип также ассоциирован с изменением чувствительности к сигналам клеточного старения и апоптоза. Важным аспектом является экспрессия мезенхимальных маркеров, таких как N-кадгерин и

виментин, которая коррелирует со способностью опухолевых клеток уклоняться от иммунологического надзора.

Было показано [120], что полученные радиорезистентные клеточные линии рака груди MCF-7 RR и ZR-751 RR обладают повышенной способностью к инвазии и миграции по сравнению с их родительскими клеточными линиями, тогда как клеточная линия MDA-MB-231 RR демонстрирует повышенную миграцию, но имеет лишь незначительное увеличение в инвазии по сравнению с родительскими клетками. Результаты показывают, что эти линии клеток RR развили более агрессивный фенотип, что клинически может привести к большему потенциалу метастазирования.

Статус белка *p53* связан со статусом гена *p53*. Раковые клетки могут иметь три различных состояния гена *p53*: *p53* дикого типа (*p53wt*), *p53* мутантного типа (*p53mt*) и делецию *p53* (*p53* нулевого типа или *p53null*) [121, 122].

Мутации *p53* широко распространены и встречаются примерно в 50% случаев рака, выявляемых у людей [122]. Наиболее распространенными и хорошо охарактеризованными мутациями *p53* являются миссенс-мутации (75%). Другие изменения включают инсерции со сдвигом рамки считывания и делеции (9%), нонсенс-мутации (7%), молчащие мутации (5%) [123].

Ген *p53mt* кодирует белок *p53mt*. *p53mt* предотвращает апоптоз и способствует пролиферации и метастазированию раковых клеток [124] *p53mt* деактивирует специфичную к последовательности нуклеотидов ДНК-связывающую активность, тем самым вызывая потерю онкосупрессорной функции, характерной для *p53* дикого типа. Кроме того, *p53mt* вызывает «усиление функции» («gain of function»), которое не только способствует прогрессированию, миграции и метаболизму опухоли. Важным следствием этого является повышение устойчивости к лучевой терапии [125].

Альтернативный механизм радиорезистентности наблюдается в *p53null*-опухолевых клетках, где полное отсутствие белка приводит к неспособности осуществить остановку цикла в G1/S-контрольной точке, что также повышает выживаемость клеток после облучения [126, 127].

В целом раковые клетки, несущие p53wt, более чувствительны к радиации, чем клетки, несущие p53mt или p53null [128]. Но имеются и противоречия, так как некоторые исследования показали, что клетки p53null более радиочувствительные, чем клетки p53wt.

Был проведен ряд экспериментов [129], в ходе которых сравнивали выживаемости опухолевых клеток головы и шеи с разным состоянием *p53*. Результаты показали, что клетки с утратой *p53* более чувствительны к воздействию гамма-излучения. Предполагали, что во время лучевой терапии в этих клетках может запускаться независимый от *p53* путь апоптоза.

Однако мнения об этом механизме противоречивы. p53null-зависимая радиорезистентность также наблюдается в опухолевых клетках. В другом исследовании [130] крысам вводили три типа опухолевых клеток с различными вариантами *p53* и облучали крыс с опухолями. Результаты показали, что опухоли у крыс с нулевым p53 были больше.

Эксперимент [131] также определил, что делеция p53 вызывает радиорезистентность клеток. Предполагается, что эта радиорезистентность преимущественно связана с ингибированием *p53*-зависимого апоптоза.

В другом исследовании [132] из линии клеток H1299, которая является p53-дефицитной, с помощью методов генной инженерии получали две новые линии, в одной из которых p53 был представлен в мутантной форме, а в другой – в виде дикого фенотипа. После воздействия ионизирующего излучения на клетки описанных выше линий было показано снижение жизнеспособности клеток только в линии, где p53 представлен в диком типе. Следовательно, на опухолевые клетки ген p53 оказывает радиосенсибилизирующее действие.

Влияние p53 на радиочувствительность опухолевых клеток остается предметом дискуссий. Одни связывают отсутствие этого белка с повышением чувствительности к облучению, другие – с развитием резистентности. Глубокое понимание взаимосвязи между p53 и радиочувствительностью поможет повысить эффективность лучевой терапии и улучшить прогноз для пациентов.

1.4. Стереотаксическая радиотерапия опухолей

Сегодня в лучевой терапии активно используется высокодозовое облучение различных новообразований. Такое направление известно как стереотаксическая радиотерапия, цель которой обеспечить высококонформное распределение дозы в целевом объёме с минимальным облучением нормальных тканей [133]. Наиболее подходящая доза и фракционирование при стереотаксической радиотерапии выбираются с учётом размера и локализации опухоли, близости органов-мишеней и биологической эффективной дозы. При однократной стереотаксической радиотерапии обычно используется доза 15-34 Гр, а при фракционированной стереотаксической радиотерапии – 30 и 75 Гр в 2-5 фракциях [134].

В течение нескольких лет лучевая терапия все больше ориентировалась в сторону гипофракционирования на основе как радиобиологического обоснования, так и технической возможности безопасного введения более высоких доз за фракцию. Гипофракционирование имеет дополнительные преимущества с точки зрения удобства для пациентов и уменьшения количества сеансов. Умеренная или тяжелая гипофракционирование, включая стереотаксическую лучевую терапию тела (SBRT), является текущим стандартом лечения многих интра- и экстракраниальных локализаций.

Исторически сложилось так, что фракционирование лучевой терапии было единственным способом обеспечить высокие дозы облучения, убивающие раковые клетки, и при этом не повредить органы, подверженные риску (OAR), используя разницу в радиочувствительности между здоровыми тканями и опухолью (дифференцированный эффект). При обычном фракционировании у здоровых клеток было время восстановить повреждения ДНК между сеансами облучения. Согласно радиобиологическим концепциям, увеличение дозы на один сеанс облучения приводило к одинаковой смертности здоровых тканей и опухоли и, следовательно, к потере дифференцированного эффекта. Только в 1950-х годах стало возможным безопасно доставлять высокие дозы облучения на небольшие участки. Изначально этот метод применялся для лечения доброкачественных и

злокачественных опухолей головного мозга, пока технические усовершенствования 1990-х годов не позволили рассматривать движущиеся мишени и, наконец, расширить показания для лечения внечерепных опухолей (SBRT).

Однократная фракция может предложить несколько преимуществ:

1) В нескольких доклинических моделях сообщалось об увеличении апоптоза эндотелиальных клеток при повышении дозы, даже в очень широком диапазоне [135]. Таким образом, однократное введение высокой дозы теоретически может быть более токсичным для васкуляризации опухоли и её микроокружения.

2) Для пациента однократное посещение сокращает время в пути и пребывание в больнице, а также позволяет избежать возможные перерывы в системном лечении.

3) Гипофракционирование (умеренное или экстремальное) даёт организационное преимущество на уровне отделения. При этом снижается загруженность аппаратов и повышается их пропускная способность. Это особенно важно при постоянно растущем числе пациентов, проходящих лучевую терапию. Это также может быть выгодно с медико-экономической точки зрения в случае оплаты лучевого лечения.

И, наоборот, лечение однократной фракцией вызывает несколько вопросов:

1) Радиобиологические вопросы:

- Неопределенность существует при моделировании и расчете эквивалентной дозы. В нескольких исследованиях была поставлена под сомнение актуальность линейно-квадратичной модели для высоких доз за фракцию, в некоторых из них была указана завышенная оценка выживаемости клеток, наблюдаемая *in vitro*, в других – недооценка эффекта, наблюдаемого в клинической практике. Были созданы некоторые модели, чтобы попытаться максимально точно приблизиться к наблюдаемой выживаемости клеток при высоких дозах, такие как модель универсальной кривой выживаемости, которая

сочетает в себе как линейную квадратичную, так и многозадачную модели. Это, в частности, позволяет рассчитать эквивалентность между однофракционными и мультифракционными схемами; однако единого мнения нет, и дебаты продолжаются [136].

- Ещё одним недостатком однократного облучения является возможное снижение иммуногенности при очень высоких дозах. Ванпуй-Бокс и соавторы показали, что дозы выше 12 Гр стимулируют Treh1-экзонуклеазу, что приводит к деградации цитозольной ДНК и, следовательно, к ингибированию cGAS/STING-пути, который необходим для стимуляции индуцированного радиацией иммунного ответа [137]. Это явление объясняет, почему при сочетании с иммунотерапией предпочтительнее использовать гипофракционированные режимы (3×8 Гр), а не однократное облучение.

- Наконец, некоторые исследователи сообщают, что гипоксия может сохраняться в качестве ограничивающего фактора, несмотря на использование очень высоких доз на фракцию. Было показано, что при многофракционном *по сравнению с однофракционным* лечении вторичные поражения головного мозга и лёгких демонстрируют более высокую эффективность, что позволяет предположить, что при лечении гипоксических опухолей предпочтительнее проводить фракционное лечение, чтобы обеспечить реоксигенацию [138].

2) Технические вопросы:

- Одна из проблем, связанных с SF, заключается в географическом промахе, поскольку одноразовое лечение подразумевает уникальный шанс доставить запланированную дозу в нужном объеме. Из-за присущих SBRT физических характеристик даже минимальные сдвиги могут иметь пагубные последствия (недостаточная дозировка GTV или передозировка OAR). SF-SBRT требует высочайшей точности при проведении лечения, что является сложной задачей, особенно при подвижных экстракраниальных поражениях. Для лечения этих поражений обязательны специальные методы (гейтинг, задержка дыхания на глубоком вдохе, трекинг, 4D-планирование).

- Еще одним предметом дискуссий является идеальная допустимая погрешность. Фракционирование позволяет снизить вероятность случайных ошибок за счет повторения сеансов. По определению, один сеанс не имеет случайной ошибки, но может быть подвержен систематическим ошибкам (неоптимальное слияние дозиметрической КТ и МРТ при поражениях головного мозга, например) с потенциально вредными последствиями.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Культуры клеток и условия их культивирования

Все исследования выполняли на культивируемых опухолевых клетках человека: A549 (карцинома легкого человека), имеющую дикий тип p53 (рис. 2), p53-дефицитную H1299 (немелкоклеточный рак легкого) (рис. 3) и HeLa (карцинома шейки матки), фенотип клеток в культуре представлен на рисунке 4.

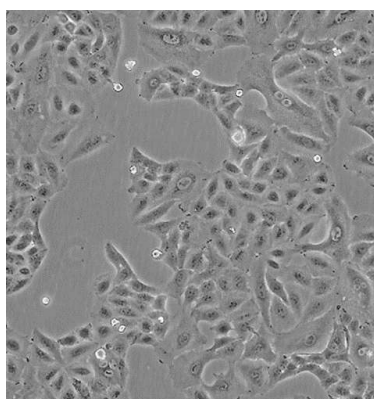


Рисунок 2 – Культура клеток линии A549. Объектив $\times 40$

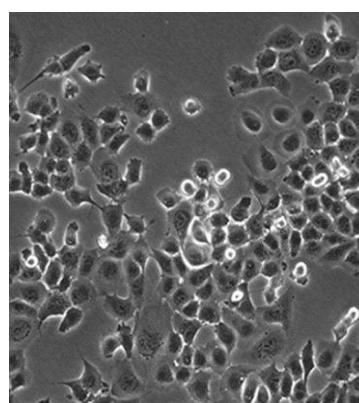


Рисунок 3 – Культура клеток линии H1299. Объектив $\times 40$

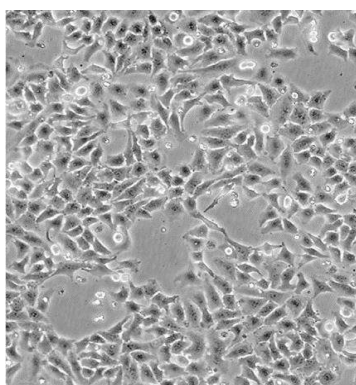


Рисунок 4 – Культура клеток линии HeLa. Объектив $\times 40$

Клеточная линия A549 представляет собой гипотриплоидную популяцию альвеолярных базальных эпителиальных клеток, относящихся к аденокарциноме легкого. Цитогенетический анализ выявляет модальное число хромосом 66, наблюдаемое у 24% клеточной популяции, с сопутствующим наличием клеток, содержащих 64 и 67 хромосом. Полиплоидные варианты встречаются с низкой

частотой (0,4%). Данная клеточная модель широко применяется в экспериментальной онкологии как репрезентативная система для изучения немелкоклеточного рака легкого, а также в качестве *in vitro* модели альвеолярного эпителия II типа.

Клетки A549 были хорошо охарактеризованы на протяжении многих лет и представляют ценность для исследователей, которые регулярно используют их в качестве моделей *in vitro* и *in vivo*. Эти клетки имеют плоскую форму и отвечают за диффузию таких веществ, как вода и электролиты, через альвеолы легких. Клетки A549 представляют собой альвеолярные базальные эпителиальные клетки человека, которые растут адгезивно в виде монослоя *in vitro*.

Клеточная линия H1299, происходящая из метастатического поражения лимфатического узла при немелкоклеточном раке легкого, представляет собой ценную экспериментальную модель для онкологических исследований. Будучи иммортализованной, данная линия обладает неограниченным пролиферативным потенциалом. Генетический анализ выявил гомозиготную делецию локуса TP53, что приводит к полному отсутствию экспрессии функционального белка p53 – ключевого регулятора клеточного цикла и апоптоза [139].

Линия клеток HeLa имеет уникальные свойства – исключительная жизнеспособность и высокая пролиферативная активность. Ключевой особенностью клеток HeLa является активность теломеразы, фермента, предотвращающего старение клеток путем поддержания длины теломер. В результате они преодолевают предел Хейфлика, характерный для большинства нормальных клеток, и способны к неограниченному делению.

Кроме того, эти клетки характеризуются гипертриплоидным набором хромосом ($3n+$), что означает наличие более чем 3-х полных комплектов хромосом. Среднее число хромосом в таких клетках составляет 82, однако может варьироваться от 70 до 164, в отличие от стандартного диплоидного числа 46.

Структура кариотипа клеток HeLa также отличается высокой степенью анеуплоидии и структурных перестроек. Наличие маленькой телоцентрической

хромосомы наблюдается в 98% клеток, а полная анеуплоидия была выявлена во всех изученных клетках.

Культивирование клеточных линий проводили в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Линии A549 и HeLa поддерживали в среде DMEM, а линию H1299 – в среде RPMI-1640 (обе от Thermo Fisher Scientific, США). Все среды содержали 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific, США) и смесь антибиотиков пенициллин-стрептомицин.

Клеточные культуры пассировали при достижении плотности популяции 75-80% путем трипсинизации с последующим пересевом на экспериментальные субстраты (покровные стекла) или в культуральные сосуды для дальнейшего роста.

2.2. Условия радиационного воздействия

Клеточные культуры подвергали облучению на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) (рис. 5). Процедуру проводили при стандартных температурных условиях (37°C) для поддержания нормального метаболизма клеток во время радиационного воздействия.

Данное устройство представляет собой самозащищенную рентгеновскую установку, состоящую из двухсекционного освинцованного шкафа. В верхней секции расположены два рентгеновских аппарата РАП-220-5, а в нижней – камера для облучения, в которой размещена полка для установки исследуемых объектов, а в ее нижней части – дозиметр ДРК-1.

Клетки A549RR, HeLaRR и H1299RR были получены после острого облучения родительских клеток в дозе 15 Гр. Параметры воздействия: напряжение 200 кВ, ток 10 мА, мощность дозы 0,85 Гр/мин, с использованием алюминиевого фильтра 1,5 мм [140]. Выбор данной дозы соответствует принципам гипофракционирования в стереотаксической радиотерапии [141-143].



Рисунок 5 – Рентгеновская биологическая установка РУБ РУСТ-М1 (Россия)

Схема расположения излучателей установки РУСТ-М1 представлена на рисунке 6.

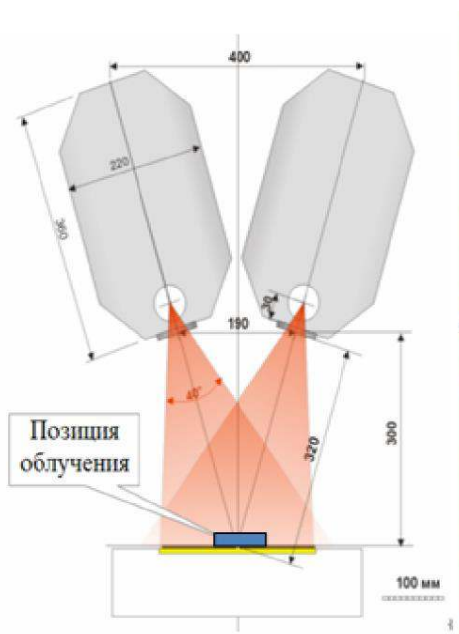


Рисунок 6 – Схема расположения излучателей установки РУСТ-М1

После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях (37°C , 5% CO_2) в течение нескольких недель до стабилизации пролиферативной активности и нормализации фенотипа клеток. Дальнейшее (дополнительное) радиационное воздействие проводили в дозах 5 и 10 Гр, как имитирующее гипофракционированное облучение, так и для выявления приобретенных свойств у выживших после острого облучения в дозе 15 Гр опухолевых клеток. Кроме этого,

для построения кривых зависимости доза-эффект по клоногенному тесту и миграционной способности, исходные и выжившие после облучения в дозе 15 Гр опухолевые клетки облучали в дозах 2, 4 и 6 Гр.

2.3. Схема эксперимента

С целью оценки развития устойчивости к действию ионизирующего излучения исходные клетки (A549, HeLa, H1299) были облучены в дозе 15 Гр. Выжившие после облучения клетки этих линий (условно были обозначены как A549RR, HeLaRR и H1299RR) подвергались повторному воздействию рентгеновского излучения в различных дозах. Общая экспериментальная схема представлена графически на рисунке 7.

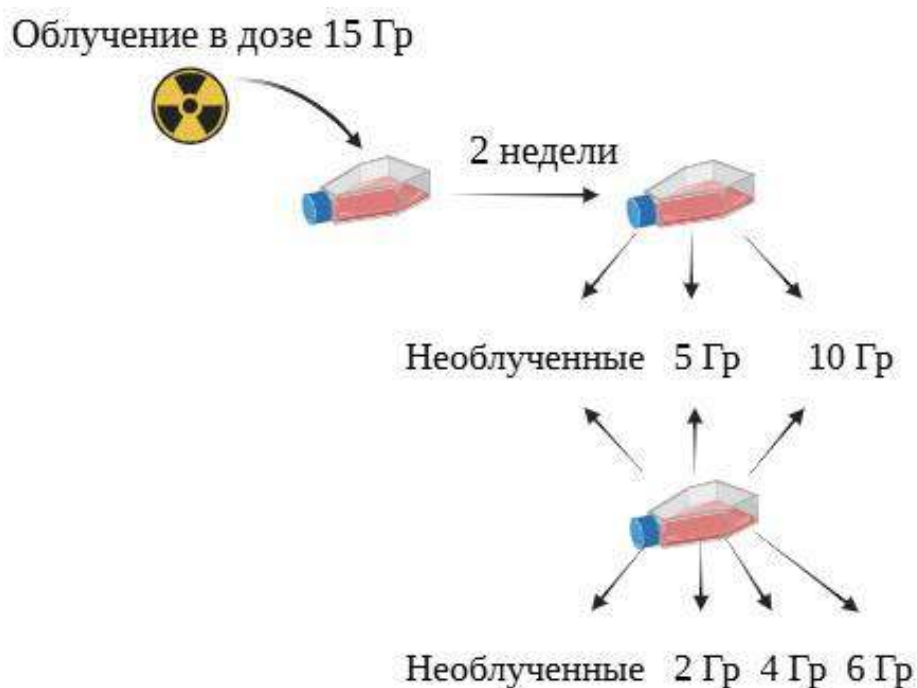


Рисунок 7 – Схема эксперимента

Дозы 5 и 10 Гр дополнительного облучения были выбраны как варианты гипофракционированного облучения при стеретаксической лучевой терапии, при которой время между фракциями значительно больше, чем при стандартном фракционировании [144, 145]. Кроме того, такие высокие дозы вызывают ярко

выраженные биологические эффекты в опухолевых клетках, что делает удобным проведение сравнительных исследований.

Для построения зависимости «доза-эффект» в части экспериментов использовали дозы 2, 4 и 6 Гр. Эти дозы часто используются в исследованиях, что делает возможным сравнение и интерпретацию своих результатов с данными литературы.

2.4. Кривые роста для оценки времени удвоения клеточной популяции

Для сравнительной оценки скорости роста исходных и полученных после облучения в дозе 15 Гр клеток использовали показатель времени удвоения популяции, для чего клетки высевали плотностью 10^5 клеток на культуральный флакон площадью 25 см². Всего готовили по 10 флаконов для каждой линии клеток и ежедневно в течение 5-суточного периода мониторинга клетки ферментативно (0,25% трипсин, ПанЭко, Россия) снимали с флаконов, переводили в клеточную суспензию с последующим подсчетом в камере Горяева. Для точного построения кривой роста подсчет клеток выполняли дважды в день с интервалом 6 часов (итого 10 флаконов за 5 суток). Результаты представлены в виде средних значений, полученных в 5-6 независимых повторностях опыта.

Среднее время удвоения клеточной популяции ($T_{1/2}$) рассчитывали по формуле 1:

$$T_{1/2} = t \ln 2 / \ln(N_t/N_0), \quad (1)$$

где N_0 – начальное число клеток; N_t – число клеток в момент времени t ; t – время логарифмической фазы роста клеточной культуры.

2.5. Иммуноцитохимическое окрашивание на γ H2AX и Ki-67

Кроме оценки динамики пролиферативного процесса с помощью ежедневного подсчета клеток, проводили иммуноцитохимический анализ пролиферативного статуса клеток с применением антител к ядерному антигену

Ki-67 – общепризнанному маркеру клеточной пролиферации, экспрессирующемуся во всех активных фазах клеточного цикла (G1, S, G2 и M), но отсутствующему в клетках, находящихся в фазе покоя (G0). В исследованиях использовали первичные антитела производства Merk-Millipore (США) в сочетании со флуоресцентно-меченными вторичными антителами из наборов Life Technologies (США), что позволило провести точную количественную оценку пролиферативного статуса клеточной популяции.

На первом этапе клетки высевали в концентрации 10^5 клеток/чашку на стерильные покровные стекла, размещенные в чашках Петри диаметром 35 мм (Corning, США). Объем питательной среды составлял 3 мл на каждую чашку. После посева клетки инкубировали в стандартных условиях (37°C , 5% CO_2) до достижения полной адгезии и стабилизации метаболической активности.

Для количественной оценки остаточных фокусов репарации ДР ДНК применяли иммуоцитохимический анализ с использованием специфических антител к ключевым белкам репарационного комплекса. Образование репарационных фокусов, представляющих собой динамические ядерные структуры с высокой концентрацией маркерных белков, позволяет визуализировать локализацию и количественную динамику восстановления повреждений ДНК. Флуоресцентно-меченные антитела обеспечивают детекцию этих структур в виде дискретных фокусов, анализ которых дает информацию о пространственно-временной организации репарационных процессов в клеточном ядре. В данном исследовании проводился количественный анализ гистона H2AX, фосфорилированный по серину-139 (γ -H2AX). Фосфорилирование H2AX осуществляется сенсорными киназами ATM, ATR и ДНК-ПК в ответ на образование двунитевого разрыва и свидетельствует о его распознавании. Для анализа фокусов γ -H2AX использовались первичные антитела к γ -H2AX (Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139) Antibody, Merk-Millipore) и коммерческие наборы для иммуоцитохимии, содержащие вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами (Life Technologies).

Для визуализации и подсчета ДР ДНК и характеристики пролиферативного потенциала клеточных культур, клетки исходных линий, клетки после предварительного облучения в дозе 15 Гр и клетки, подвергнутые дополнительному радиационному воздействию в дозах 5 и 10 Гр через 24 часа после облучения высевали на стерильные покровные стекла, размещенные в чашках Петри для последующего иммуноцитохимического анализа. Экспериментальная процедура выполнялась в соответствии с общепринятым протоколом [146] с модификациями. Первичную фиксацию клеток проводили 20 минут при комнатной температуре с использованием 4% раствора параформальдегида, приготовленного на фосфатном буфере (pH 7,4). После двукратного промывания буферным раствором осуществляли пермеабиллизацию клеточных мембран 0,3% раствором Тритона X-100 в фосфатно-солевом буфере с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), что обеспечивало эффективное блокирование неспецифических сайтов связывания антител.

На следующем этапе покровные стекла с фиксированными клетками перемещали на предметные стекла для проведения иммуноцитохимического окрашивания. Обработку образцов осуществляли моноклональными первичными антителами кроличьего происхождения, специфичными к фосфорилированному гистону γ H2AX (производство Merck-Millipore). Инкубацию проводили в течение 60 минут при комнатной температуре, используя рабочий раствор антител в разведении 1:200, приготовленный на основе фосфатно-солевого буфера с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Последующую обработку осуществляли флуоресцентно-меченными вторичными антителами: козыими анти-мышинными IgG-Alexa Fluor 488 (Life Technologies, 1:600) и козыими анти-кроличьими IgG-Rhodamine (Merck-Millipore, 1:400) в аналогичных условиях. Все инкубации проводили в фосфатном буфере (pH 7,4) с 1% БСА для минимизации неспецифического связывания.

Для визуализации ядерного материала и предотвращения фотовыцветания использовали иммерсионную среду ProLong Gold с DAPI (Life Technologies,

США), обеспечивающую одновременное контрастирование хроматина и долговременную стабилизацию флуоресцентного сигнала.

На рисунке 8 показаны последовательно основные этапы проведения иммуноцитохимического окрашивания.

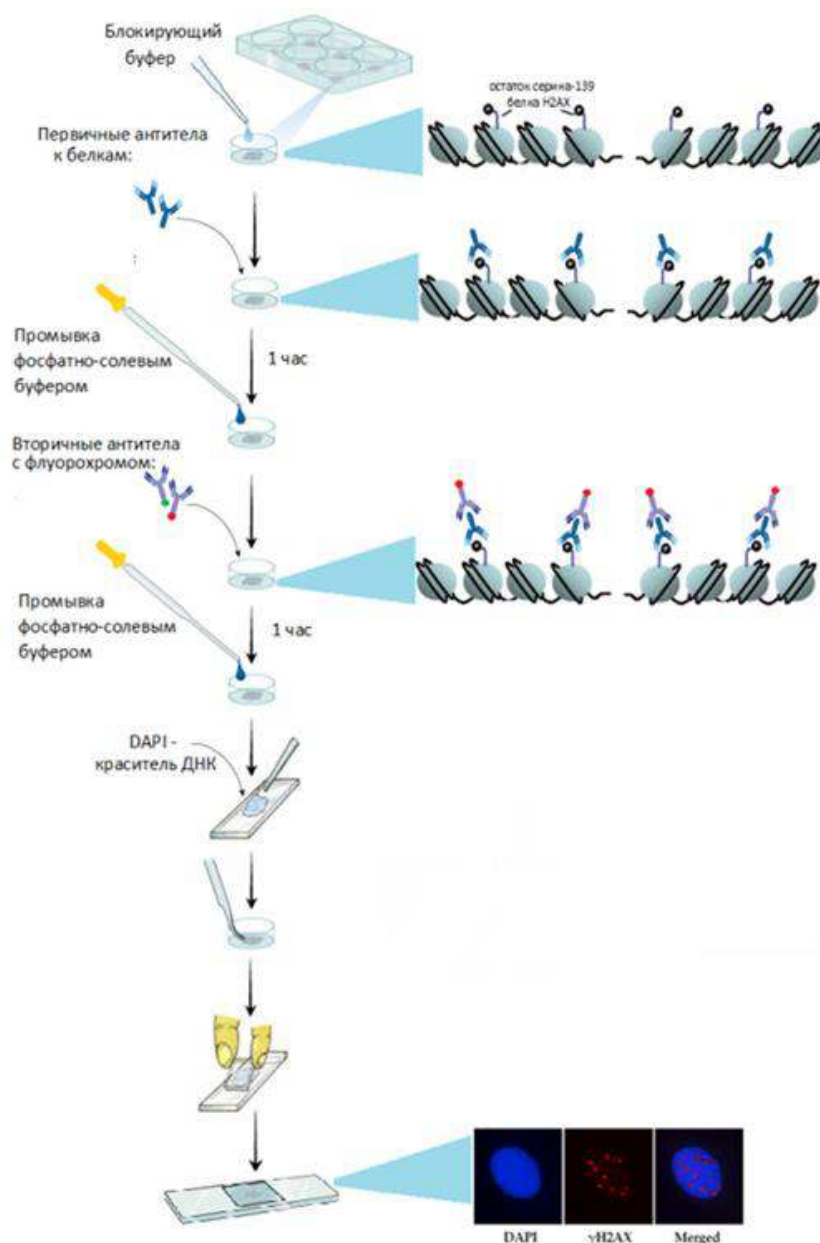


Рисунок 8 – Основные этапы проведения иммуноцитохимического окрашивания

Флуоресцентную микроскопию выполняли на системе Nikon Eclipse Ni-U (Япония), оснащенной высокочувствительной камерой ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия). Для детекции различных флуорофоров применяли специализированные фильтры: UV-2E/C (DAPI), B-2E/C (FITC/Alexa Fluor 488) и

Y-2E/C (Rhodamine) (рис. 8). Статистически значимый анализ включал оценку не менее 200 клеток на каждую экспериментальную точку.

2.6. Оценка клеточной гибели и стадий клеточного цикла

Для оценки клеточной гибели использовали двойное окрашивание клеток флуоресцентными красителями пропидий йодид (PI) и YO-PRO-1. Различия между данными красителями заключаются в их различной способности проникать в клетки. Данная методика основана на дифференциальной проницаемости клеточных мембран: YO-PRO-1 проникает в клетки с начальными нарушениями мембранной целостности, характерными для раннего апоптоза, тогда как PI окрашивает только клетки с выраженной мембранной деструкцией (поздний апоптоз или некроз). Таким образом, анализ флуоресцентного профиля позволяет дифференцировать:

- Жизнеспособные клетки (YO-PRO-1-/PI-);
- Ранний апоптоз (YO-PRO-1+/PI-);
- Поздний апоптоз (YO-PRO-1+/PI+);
- Некроз (YO-PRO-1-/PI+).

Количественное определение распределения гибнущих клеток по стадиям апоптоза и по пути некроза выполняли методом проточной цитометрии с применением коммерческого набора реагентов "Vybrant Apoptosis Assay Kit #4" (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США, кат. № V13243), содержащего флуоресцентные красители YO-PRO-1 и PI. Клеточную суспензию плотностью 5×10^5 клеток в объеме 0,5 мл инкубировали с добавлением 0,5 мкл исходного раствора YO-PRO-1 и 0,5 мкл PI в течение 20-30 минут при температуре 0-4°C.

Цитофлуориметрический анализ проводили на цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) используя 488 нм лазер, регистрируя флуоресценцию в зеленом (YO-PRO-1) и красном (PI) спектральных диапазонах. Для статистической достоверности в каждом образце анализировали 10 000 клеточных

событий с последующей обработкой данных в программном обеспечении FlowJo V10 (Becton Dickinson, США).

Для анализа стадий клеточного цикла клетки в экспоненциальной фазе роста подвергали трипсинизации с последующим ресуспендированием в охлажденном фосфатном буфере (10^7 клеток/группу). Фиксацию осуществляли в 70% этаноле при 4°C в течение 30 минут с последующим хранением при -20°C. На подготовительном этапе клеточную суспензию подвергали двукратному центрифугированию с заменой надосадочной жидкости на свежий фосфатный буфер (pH 7,4). Последующую инкубацию проводили в течение 30 минут при комнатной температуре в светозащищенных условиях с рабочим раствором, содержащим пропидиум йодид в концентрации 0,5 мг/мл и РНКазу. Цитофлуориметрию выполняли на системе BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с регистрацией 50 000 событий на каждый анализируемый образец.

Для интерпретации полученных данных распределение клеточной популяции по фазам клеточного цикла (G0/G1, S, G2/M) анализировали с применением специализированного программного обеспечения BD CellQuest Pro версии 5.1 (Becton Dickinson, США).

2.7. Цитогенетический анализ (микроядерный тест)

В биодозиметрии и токсикологии микроядерный тест широко используется для оценки генетических повреждений, вызванных ионизирующим излучением или другими мутагенными факторами. С его помощью количественно оценивают наличие микроядер, образующихся из фрагментов хромосом или целых хромосом, отставших при формировании митотического веретена.

Для оценки генотоксических эффектов применяли цитокинез-блокированный микроядерный тест [147]. По стандартному протоколу микроядерного теста клеточную культуру обрабатывали 3 мкг/мл цитохалазина-Б (Панэко, Россия) на протяжении 22-23 часов для блокирования цитокинеза с формированием двуядерных клеток. После трипсинизации клетки

последовательно подвергали: гипотонической обработке 0,75 мМ КСl (20 мин, 37°C); фиксации метанол-уксусной кислотой (3:1). Финальным этапом было приготовление препаратов и их окрашивание акридиновым оранжевым.

Количественный анализ частоты образования микроядер выполняли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Япония), используя камеру ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия). Критерием оценки служил подсчет минимум 1 000 двуждерных клеток на экспериментальную группу с распределением их по категориям в зависимости от количества микроядер (1, 2, 3 и более) (рис. 9).

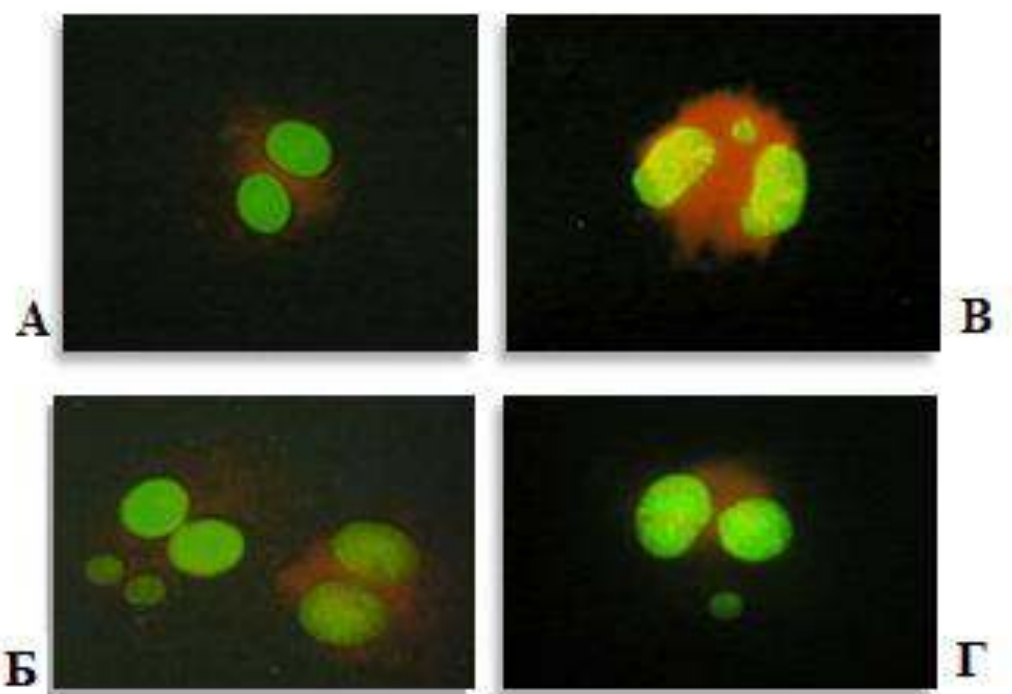


Рисунок 9 – Цитохалазин-блокированные двуждерные клетки с микроядрами:

А – без микроядер; Б – с двумя микроядрами; В, Г – с одним микроядром

2.8. Клоногенный тест

Репродуктивную гибель клеток оценивали по количеству колоний, формируемых спустя 3 недели после облучения. Непосредственно сразу после радиационного воздействия клетки подвергали трипсинизации для получения суспензии, после чего проводили подсчет клеточной концентрации с

последующим разведением до требуемых значений в соответствии с протоколом эксперимента. Полученную суспензию с заданной концентрацией, варьирующейся в зависимости от величины дозы облучения, высевали в чашки Петри диаметром 60 мм (Corning, США), содержащие свежую культуральную среду. Далее их инкубировали в стандартных условиях культивирования (37°C, 5% CO₂) до появления хорошо видимых колоний. После инкубации старую среду сливали, колонии фиксировали метанолом и окрашивали 3% раствором Гимзы (рис. 10). Для каждой экспериментальной группы в одном эксперименте использовали минимум 5 чашек. Всего было проведено 5-6 независимых экспериментов. Количественный анализ включал подсчет колоний и расчет показателей выживаемости по общепринятой формуле [148].

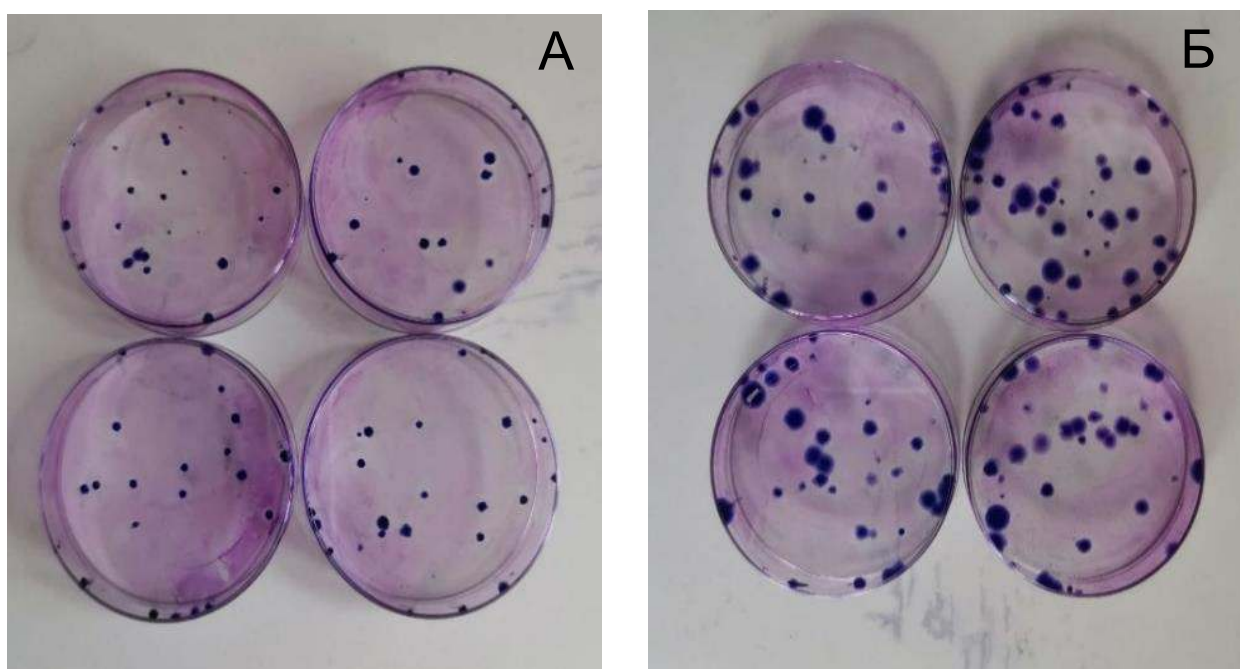


Рисунок 10 – Колонии клеток A549. А – исходные; Б – выжившие после облучения в дозе 15 Гр (A549RR)

2.9. Анализ миграционной активности клеток с помощью теста заживления «раны» («scratch test»)

Оценку миграционной и пролиферативной активности проводили с помощью теста заживления «раны». Клетки культивировали в 96-луночных

планшетах до формирования практически полного монослоя (95% плотности), после чего в клеточном слое создавали стандартизированную царапину («рану») в центре лунки (монослоя) стерильным микропипеточным наконечником. Динамику закрытия дефекта документировали через 0, 12, 24 и 48 часов с использованием высокоточного скринингового микроскопа ImageXpress Micro XL (Molecular Devices LLC, США) (рис. 11).

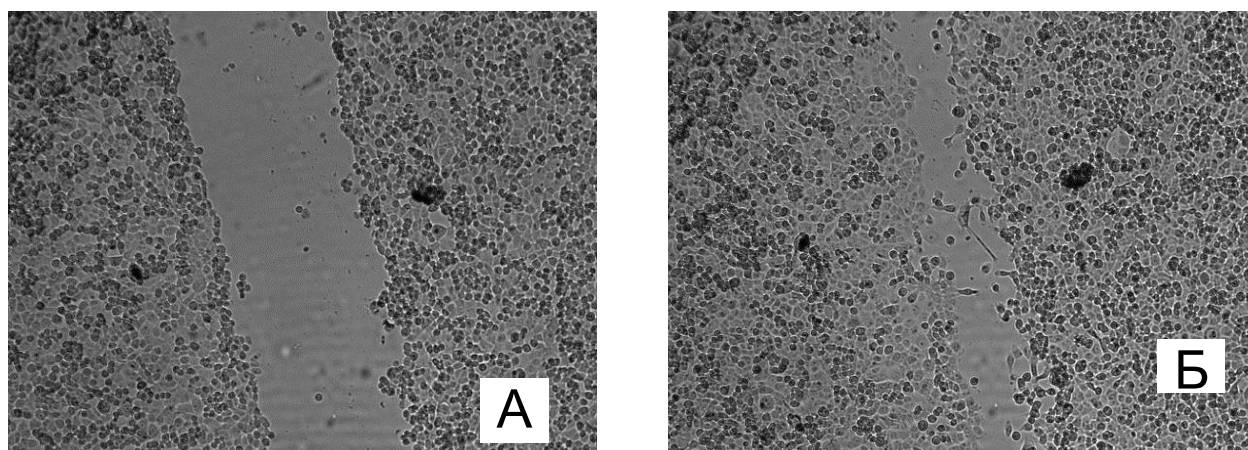


Рисунок 11 – Процесс миграции клеток H1299. Сразу после нанесения царапины (А) и спустя 24 часа (Б)

Для количественного анализа миграционной и пролиферативной активности клеток применяли программу MetaXpress версии 5.0. Вычисляли процентное сокращение площади раневого дефекта с использованием следующей расчетной формулы 2:

$$\text{Площадь застания раны, \%} = \frac{At=0h - At=\Delta h}{At=\Delta h} \times 100\%, \quad (2)$$

где $At=0h$ начальная площадь раны (мкм^2) сразу после нанесения царапины ($t = 0h$), а $At = \Delta h$ площадь раны (мкм^2), измеренная через 8, 16, 32 и 48 часов.

2.10. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ экспериментальных результатов выполняли с применением пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2019, OriginPro 8.5 и

Statistica 10.0. Все количественные данные представлены в виде средних арифметических величин, рассчитанных по результатам как минимум трех независимых повторностей эксперимента, с указанием стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

Для верификации достоверности межгрупповых различий использовали параметрический t-критерий Стьюдента, а также непараметрические критерии Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при достижении уровня значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование в лучевой терапии облучения с большими дозами в максимально сжатые сроки в ряде случаев позволяет преодолеть исходную устойчивость некоторых опухолей к облучению. Примером может служить стереотаксическое облучение метастазов в головной мозг гипернефroidного рака почки, как одной из наиболее резистентных к традиционным режимам лучевой терапии опухоли. Также показана высокая эффективность стереотаксической лучевой терапии немелкоклеточного рака легкого человека [144]. В отличие от традиционной лучевой терапии, суммарная очаговая доза при которой достигается в течение 6-8 недель, при стереотаксической лучевой терапии количество фракций значительно меньше (в случае радиохирургии однократное облучение), не превышает пяти, а разовая очаговая доза достигает 6-34 Гр. В настоящем исследовании опухолевые клетки человека линий A549, HeLa и H1299 облучали однократно в дозе 15 Гр. После облучения клетки культивировали в течение нескольких недель с постоянной сменой питательной среды на свежую до получения хорошо пролиферирующей популяции клеток. В результате были получены выжившие и давшие устойчивый рост клетки, получившие условные названия A549RR, HeLaRR и H1299RR, которые в дальнейшем были охарактеризованы и использованы в экспериментальной части работы.

3.1. Сравнительная оценка пролиферативной активности выживших и исходных опухолевых клеток человека

Для характеристики полученных клеток линий A549RR, HeLaRR и H1299RR представляет интерес сравнительный анализ динамики изменения их количества с исходными клетками без дополнительного воздействия. Для этого проводили оценку времени удвоения клеточной популяции путем ежедневного двухразового (с интервалом в 6 часов) подсчета клеток в течение 5 дней. Для каждого подсчета использовали заранее приготовленные флаконы (10 на каждую

линию) с клетками с их исходным количеством 10^5 . Анализ кинетики клеточного роста выявил значительное увеличение времени удвоения популяции у выживших после облучения в дозе 15 Гр опухолевых клеток: для A549RR (31 ч) по сравнению с исходной линией (19 ч), и для HeLaRR (30 ч) относительно исходных клеток (22 ч). В случае H1299RR отмечено умеренное, но статистически значимое увеличение $T_{1/2}$ до 27 часов (против 20 часов у контрольных клеток) (рис. 12).

Замедление темпов пролиферации, выражающееся в увеличении времени удвоения популяции, может объясняться нарушениями в регуляции клеточного цикла, формирование пула клеток в G0 стадии, так и высокий процент гибели делящихся клеток в отдаленный период времени после радиационного воздействия в высокой дозе. Для этого в дальнейшем был проведен анализ уровня гибели облученных клеток и их распределение по стадиям клеточного цикла. Следует отметить, что последующие эксперименты проводились с дополнительным радиационным воздействием, но для сравнения были получены данные и по клеткам контрольных групп (выжившие и исходные клетки без дополнительного воздействия). Все эти клетки на момент анализа и дальнейшего (дополнительного) радиационного воздействия находились в стадии экспоненциального роста, где и рассчитывалось время удвоения клеточной популяции. Как видно из рисунка 13, количество клеток в стадии G0/G1 у линий A549RR и H1299RR значительно уменьшается по сравнению с исходными и увеличивается на стадии G2/M, тогда как у клеток HeLa и HeLaRR сохраняется их процентное соотношение на всех стадиях клеточного цикла.

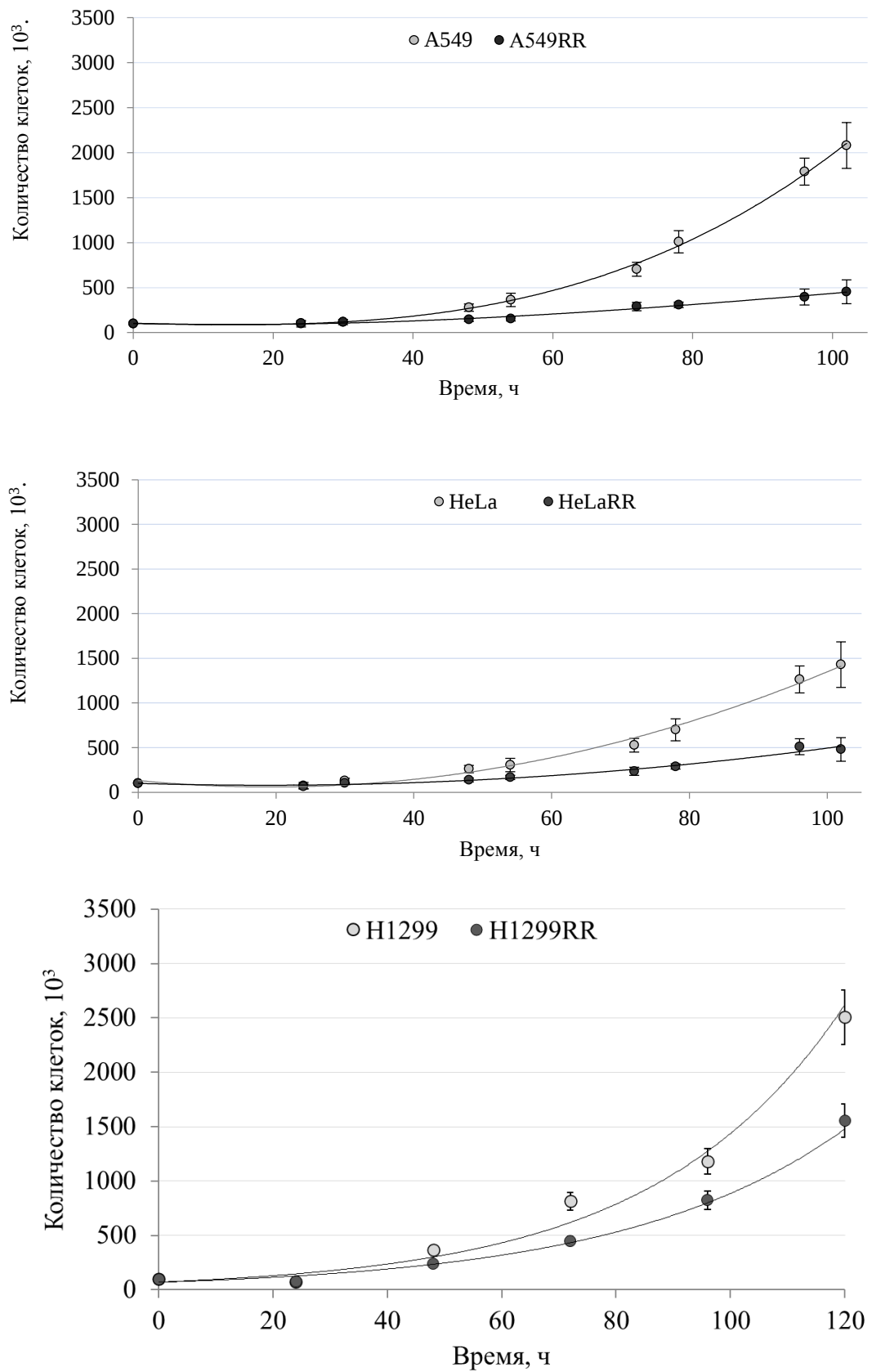


Рисунок 12 – Кривые роста культур клеток линий A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR. Представлены результаты 6 независимых экспериментов

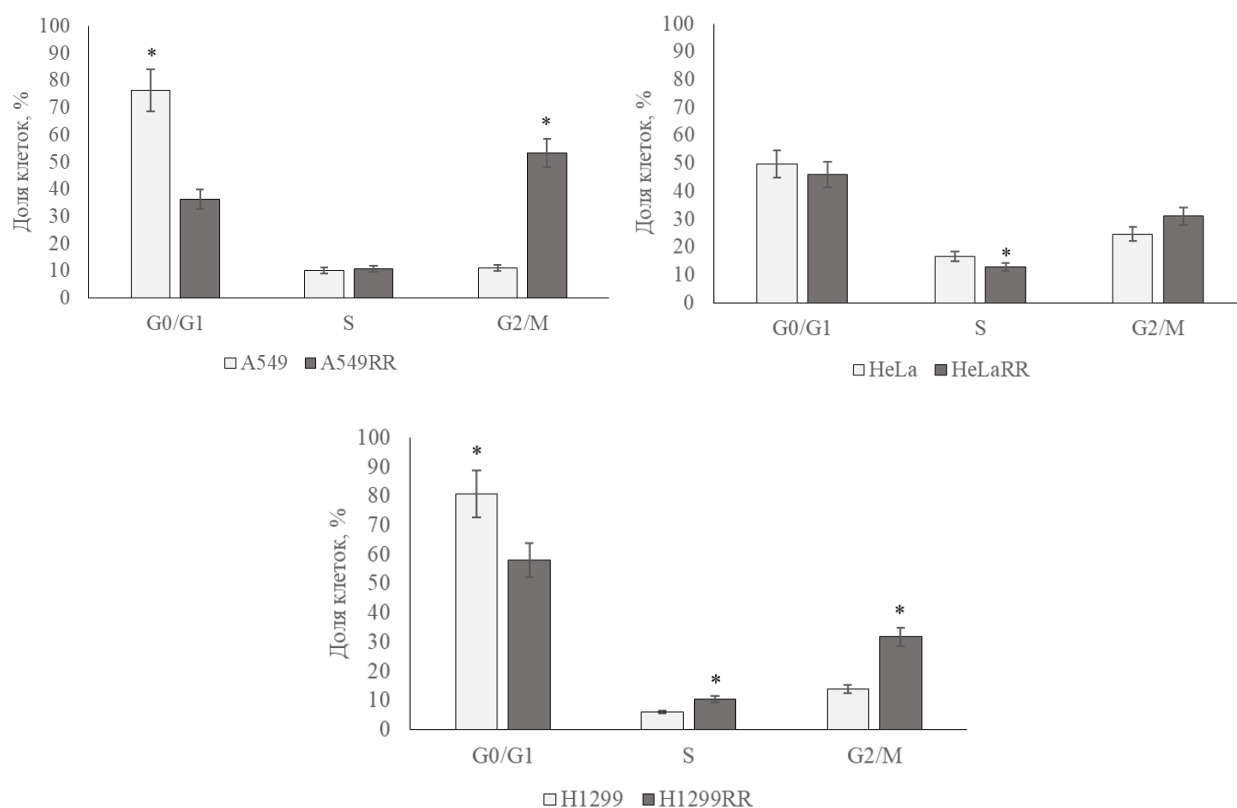


Рисунок 13 – Распределение по стадиям клеточного цикла клеток A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR в экспоненциальной фазе роста.

Представлены результаты 3 независимых экспериментов; * $p \leq 0.05$

Согласно данным литературы, клетки в G2/M-блоке клеточного цикла более чувствительны к радиационно-индуцированному апоптозу по сравнению с клетками в G0/G1-фазе. Последние характеризуются способностью к обратимому выходу из клеточного цикла с переходом в фазу покоя G0, либо активацией стрессового ответа эндоплазматического ретикулума. Такие адаптационные механизмы обеспечивают деградацию поврежденных белков и способствуют поддержанию жизнеспособности опухолевых клеток [149, 150].

Действительно, в нашем исследовании выявлен высокий процент гибнущих клеток A549RR и H1299RR по сравнению с исходными спустя несколько недель после облучения в дозе 15 Гр (Таблица 1).

Таблица 1 – Процентное распределение гибнущих клеток

Линия	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз
A549	2,94±0,59	0,49±0,09	1,92±0,38
A549RR	1,05±0,21	2,62±0,52*	6,18±1,24*
HeLa	1,20±0,10	1,46±0,04	4,35±0,32
HeLaRR	1,97±0,08	2,11±0,09	5,84±0,84
H1299	3,56±0,71	14,89±2,98	4,32±0,86
H1299RR	6,22±1,24*	29,43±5,89*	8,73±1,75*

Примечание: * – различия достоверны при $p \leq 0.05$

У клеток HeLa и HeLaRR различий по этому показателю не выявлено.

Таким образом, увеличение времени удвоения популяции клеток A549RR и H1299RR связано с высоким уровнем гибели этих клеток. Увеличение времени удвоения клеточной популяции HeLaRR, скорее всего, связано с увеличением времени прохождения стадий клеточного цикла, однако это требует дополнительных исследований.

Для оценки пролиферативной активности выживших и исходных опухолевых клеток как без, так с дополнительным радиационным воздействием, использовали маркер пролиферативной активности Ki-67. Антиген Ki-67 является ядерным протеином, экспрессия которого наблюдается в активные фазы клеточного цикла (G_1 , S, G_2 и митоз) и отсутствует в стадии покоя (G_0). Этот маркер используется для оценки скорости роста опухоли. В данном исследовании проводили сравнительный анализ пролиферативной активности выживших клеток A549RR, HeLaRR, H1299RR и их исходных клеточных линий A549, HeLa, H1299 спустя 24 часа после дополнительного рентгеновского облучения в дозах 5 и 10 Гр. Проведено 3 независимых эксперимента.

Было показано дозозависимое снижение доли Ki-67+ клеток линии A549 после дополнительного облучения (рис. 14). В клетках линии A549RR также наблюдается уменьшение доли пролиферирующих клеток после дополнительного воздействия рентгеновским излучением в дозах 5 и 10 Гр.

Результаты настоящего исследования соответствуют данным, полученным при гиперфракционированном облучении опухолевых клеток [151]. В указанной работе было показано дозозависимое уменьшение количества Ki67-позитивных клеток в родительской линии A549 после однократного воздействия в диапазоне 2-6 Гр. В нашем эксперименте с предварительно облученными клетками наблюдался сходный характер реакции при дозах 2 и 6 Гр, однако выраженность эффекта была статистически не достоверна.

Доля активно пролиферирующих клеток H1299RR без дополнительного облучения была значительно выше этого показателя у исходных клеток (рис. 14). После дополнительного облучения в дозе 10 Гр наблюдалось достоверное снижение доли активно пролиферирующих клеток H1299 по сравнению с H1299RR. Процентное количество позитивных по Ki-67 клеток HeLa оставалась на высоком уровне во всех исследованных группах.

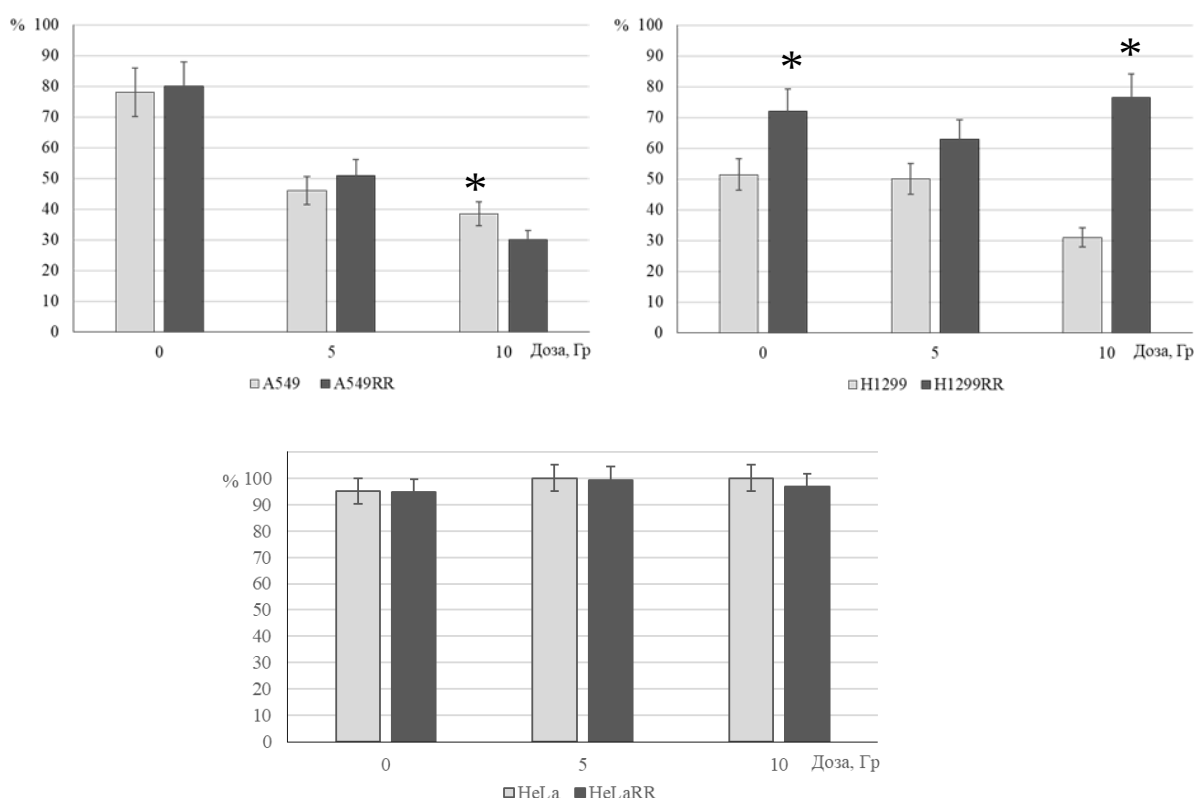


Рисунок 14 – Изменение доли Ki-67+ клеток линий A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR до и после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр; * $p \leq 0,05$

Биологическая роль белка Ki-67 непосредственно связана с прогрессией клеточного цикла. В интерфазе данный белок участвует в распределении гетерохроматиновых компонентов и ассоциации гетерохроматина с ядрышковыми структурами, тогда как в митотической фазе обеспечивает формирование перихромосомного рибонуклеопротеинового слоя [152]. Характерно, что экспрессия Ki-67 отсутствует в фазе G0, но детектируется во всех других фазах цикла. Снижение количества Ki-67-позитивных клеток в линиях A549 и A549RR указывает на дозозависимое накопление клеток в фазе G0 под воздействием дополнительного облучения. В противоположность этому, как клетки линии HeLaRR, так и родительские клетки HeLa сохраняли высокий уровень экспрессии Ki-67, что свидетельствует об активной пролиферации без перехода в состояние покоя. Данное наблюдение подтверждает наше предположение об увеличении времени прохождения стадий клеточного цикла у этих клеток. Процент Ki-67-позитивных клеток H1299RR значительно выше исходных H1299, остается на высоком уровне при всех дозах облучения, и не меняется в зависимости от дозы.

3.2. Анализ распределения выживших и исходных опухолевых клеток человека по фазам клеточного цикла после дополнительного облучения

Определение изменений в распределении опухолевых клеток по фазам клеточного цикла после облучения составляет важное направление исследований, поскольку полученные данные позволяют оценить радиочувствительность клеточной популяции. Известно, что стадии различаются по радиочувствительности и наиболее уязвимыми для клетки являются стадии G2 и митоз, где хроматин конденсируется, уменьшается количество сайтов репарации повреждений ДНК, увеличивается вероятность как кластогенных, так и анэугенных повреждений, связанных с нарушениями структуры митотического аппарата. Кроме того, после блока G2/M клетки более восприимчивы к индукции апоптоза.

Устойчивость клеток к радиационному воздействию определяется множеством механизмов, среди которых можно выделить эффективность репарации радиационно-индуцированных повреждений ДНК, реализуемой в определенных сверхочных точках клеточного цикла и селективную элиминацию клеток с нерепарируемыми повреждениями по программе апоптоза.

В работе исследовали распределение по фазам клеточного цикла клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa, HeLaRR через 24 часа после дополнительного радиационного воздействия в дозах 5 и 10 Гр. Полученные результаты демонстрируют, что в популяции клеток A549 преобладают клетки в фазе G0/G1, причем их доля статистически значимо превышает аналогичный показатель в группе предварительно облученных клеток A549RR (рис. 15). В свою очередь, выявлен высокий уровень клеток A549RR в стадии G2/M, который почти в 5 раз превышал значения исходных клеток (рис. 15). При анализе распределения клеток по фазам клеточного цикла спустя 24 часа после воздействия в дозе 5 Гр было установлено, что как в родительской линии A549, так и у линии A549RR большинство клеток находилось в G0/G1-фазе. Однако после облучения в дозе 10 Гр наблюдалось существенное изменение распределения: популяции обеих линий демонстрировали примерно равное соотношение клеток в G0/G1 и G2/M фазах.

Фиксировали низкие показатели доли клеток A549 и A549RR в S фазе, но после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр, доля исходных клеток достоверно выше, чем у предварительно облученных, что, видимо, связано с повышенным уровнем гибели у последних (рис. 15).

Доля клеток линии H1299 в основном находится в стадии G0/G1, как и у клеток линии A549, где их уровень достоверно выше, чем у предварительно облученных клеток, но картина меняется в стадии G2/M, где уже относительное количество клеток линии H1299RR заметно выше, чем у исходных клеток (рис. 15). После воздействия ионизирующим излучением в дозе 5 Гр наблюдается преобладание задержки клеточного цикла на стадии G0/G1 для обеих изучаемых клеточных линий, но также значительная доля клеток линий H1299 и H1299RR

находятся в фазе G2/M (рис. 15). В группе клеток, облученных в дозе 10 Гр, наблюдается более высокий показатель у H1299 в стадии G0/G1 по сравнению с клетками H1299RR, но в основном арест клеточного цикла у этих двух линий происходит на стадии G2/M (рис. 15).

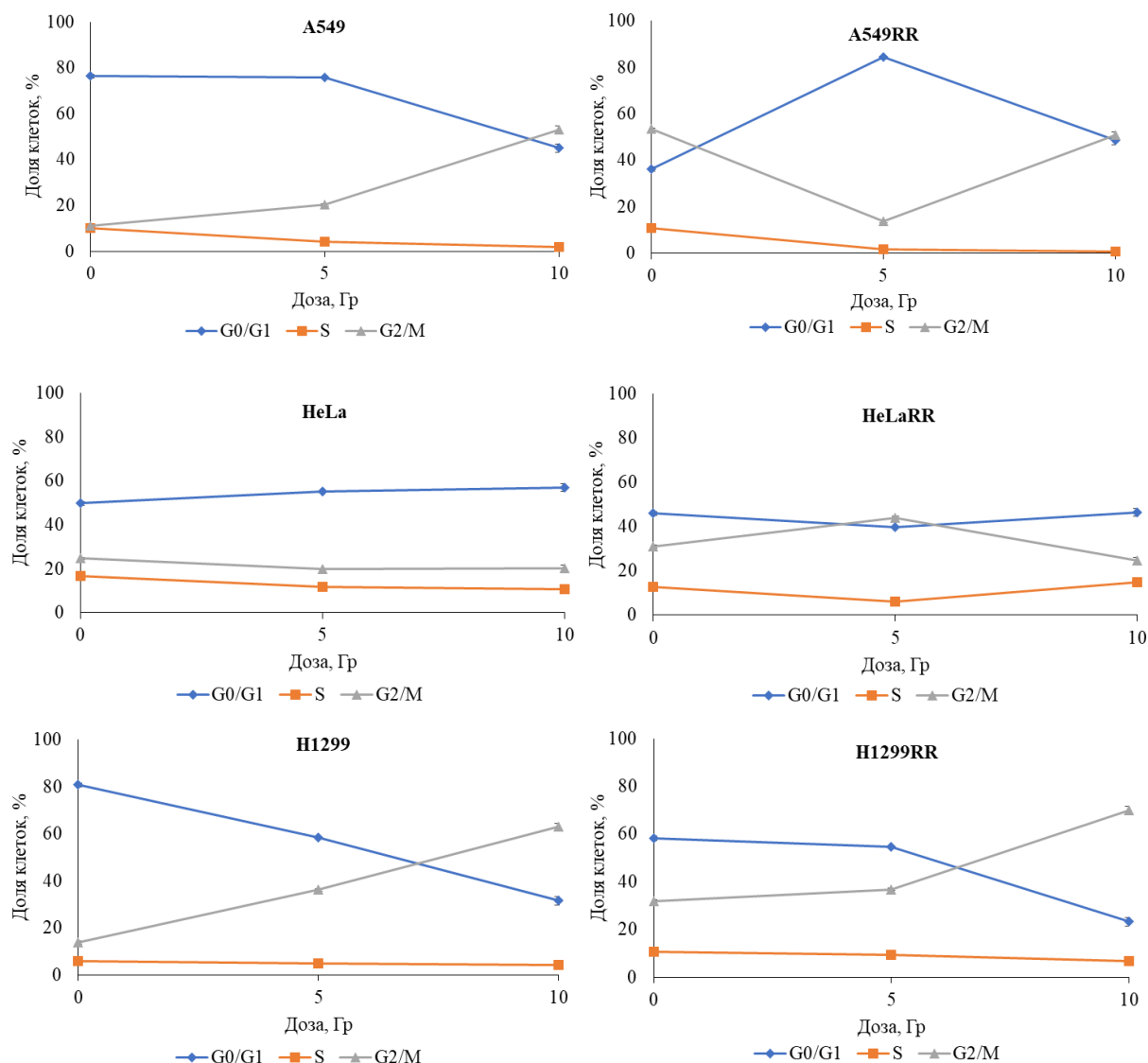


Рисунок 15 – Распределение выживших и исходных опухолевых клеток по фазам клеточного цикла после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

Проведенный сравнительный анализ продемонстрировал статистически значимое уменьшение популяции S-фазных клеток H1299 относительно предварительно облученных клеток H1299RR. Указанное различие наблюдалось, как без дополнительного облучения, так и сохранялось после радиационного воздействия в дозах 5 и 10 Гр (рис. 15).

Полученные результаты согласуются с исследованием [151], где у радиорезистентных клеток отмечалось характерное перераспределение по фазам цикла, выразившееся в снижении доли S-фазных клеток и параллельном увеличении популяции в G2/M-фазе после облучения.

Анализ линий HeLa и HeLaRR выявил преобладание клеток в G0/G1-фазе (рис. 15). При сравнении ответа на облучение в дозе 5 Гр установлено, что хотя обе линии демонстрировали значительное количество клеток в G0/G1-фазе, доля клеток родительской линии HeLa в данной фазе достоверно превышала соответствующий показатель у предварительно облученных клеток линии HeLaRR.

Анализ клеточного цикла выявил значимые различия между исходными и предварительно облученными клеточными линиями. Особенно выраженные изменения отмечались в линии HeLaRR, где доля клеток в G2/M-фазе превышала показатели родительской линии HeLa более чем в два раза после дополнительного облучения 5 Гр (рис. 15). После дополнительного воздействия излучением в дозе 10 Гр, в клеточных популяциях обеих исследуемых линий отмечалось преобладание клеток, находящихся в G0/G1-фазе клеточного цикла. Также наблюдали их достоверное количественное преимущество в G2/M-фазе по сравнению с родительскими после облучения в дозе 5 Гр (рис. 15).

Контрольная точка G1 дефектна в большинстве опухолевых клеток, обычно из-за мутаций/изменений в гене p53. По всей видимости, этим можно объяснить снижение доли клеток в G0/G1 в зависимости от дозы ионизирующего излучения в линиях H1299 и H1299RR и их преобладание в стадии G2/M клеточного цикла.

Проведенные исследования обращают внимание на возможную роль белка p53 в контроле клеточного цикла в ответ на действие ионизирующего излучения. Результаты исследования свидетельствуют о выраженной зависимости распределения клеток по фазам цикла от функционального статуса p53. Клетки с активной формой p53 демонстрируют преимущественную локализацию в G0/G1-фазе как без дополнительного облучения, так и после облучения в дозе 5 Гр. В линии HeLa данное распределение сохраняется даже после воздействия в дозе

10 Гр. В противоположность этому, отсутствие функционального p53 приводит к значительной перестройке, проявляющейся снижением доли клеток в G0/G1-фазе при параллельном увеличении популяции в G2/M-фазе. Эти результаты согласуются с общепринятой моделью, согласно которой p53 выступает центральным регулятором контрольных точек клеточного цикла при генотоксическом стрессе.

Изучение механизмов регуляции клеточного цикла занимает одно из центральных мест в понимании феномена радиочувствительности. Современные данные свидетельствуют о существовании нескольких молекулярных путей, контролирующих клеточное деление в ответ на радиационное воздействие. Установлено, что радиочувствительность клеток варьирует в зависимости от фазы цикла, достигая максимума в G2/M-фазе, тогда как S- и G1-фазы характеризуются сравнительно меньшей чувствительностью [153].

Ключевым клеточным ответом на повреждение ДНК является индукция остановки деления в G2/M-фазе, молекулярные основы которой активно исследуются. В отличие от этого, механизмы регуляции остановки в S- и G2-фазах остаются недостаточно изученными. Выявленная фазовая зависимость радиочувствительности открывает перспективы для оптимизации радиотерапии через синхронизацию клеточной популяции в наиболее уязвимой фазе. В частности, синхронизация в G2/M-фазе может значительно повысить эффективность лучевого воздействия [153, 154].

3.3. Анализ клеточной гибели выживших и исходных опухолевых клеток человека после дополнительного радиационного воздействия

Для количественной характеристики радиационно-индуцированного ответа клеток проводили сравнительный анализ показателей клеточной гибели в исследуемых клеточных линиях. Анализ выполняли в контрольной группе (без облучения) и через 24 часа после воздействия ионизирующего излучения в дозах 5 и 10 Гр. Данное исследование позволяет определить доли клеток каждой линии,

находящихся на ранней или поздней стадии апоптоза, в процессе некроза, а также общую клеточную гибель.

На рисунке 16 представлены результаты количественного анализа клеток, гибнущих по механизму апоптоза в ранней его стадии после дополнительного воздействия рентгеновским излучением в дозах 5 и 10 Гр.

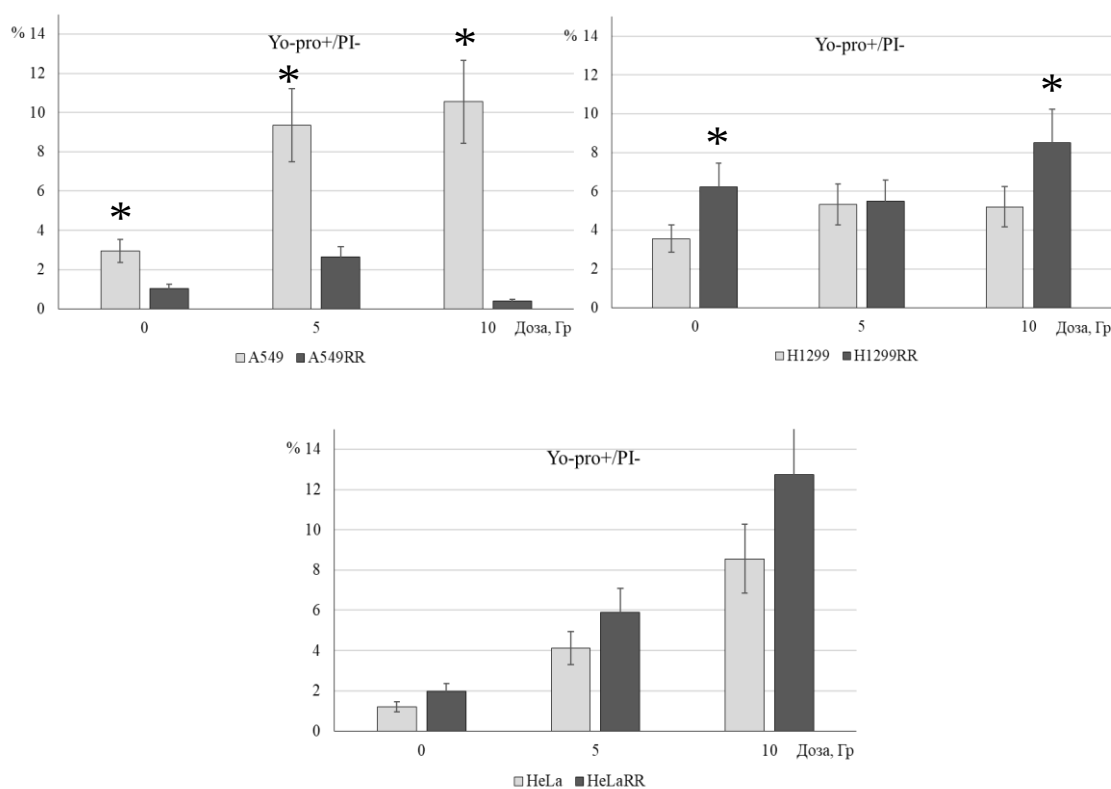


Рисунок 16 – Доля клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR в ранней стадии апоптоза спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр; * $p < 0,05$

Проведенный количественный анализ продемонстрировал статистически значимое преобладание гибнущих клеток A549 в ранних стадиях апоптоза по сравнению с предварительно облученными клетками A549RR. Данное различие наблюдалось в контроле и сохраняло статистическую значимость после облучения в дозах 5 и 10 Гр, что свидетельствует о сохранении повышенной апоптотической чувствительности родительской линии при различных режимах радиационного воздействия (рис. 16).

Полученные данные могут быть объяснены ингибированием процессов раннего апоптоза в полученной нами линии A549RR по сравнению с исходной клеточной линией A549.

Сравнительный анализ линий H1299 и H1299RR не выявил статистически значимых различий в доле раннеапоптотических клеток при сравнении облученных и необлученных образцов. Однако сравнение этих двух линий между собой продемонстрировало повышенный базовый уровень и радиационно-индуцированный (10 Гр) апоптоз в H1299RR относительно родительской линии (рис. 16).

Процент гибнущих клеток HeLa и HeLaRR в стадии раннего апоптоза дозозависимо увеличивался после облучения в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с контролем. Наблюдаемый эффект, зафиксированный в обеих сравниваемых клеточных популяциях, указывает на раннюю активацию апоптотической гибели в ответ на радиационное воздействие (рис. 16).

Количественная оценка клеток A549 и A549RR в позднем апоптозе показала низкие значения, не превышавшие 5% ни в одной из экспериментальных групп (рис. 17).

Сравнительный анализ линий H1299 и H1299RR продемонстрировал статистически значимое увеличение доли клеток в позднем апоптозе у линии H1299RR для всех групп (рис. 17).

Количество клеток HeLa и HeLaRR достоверно не различались даже после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр по сравнению с контрольной группой, и доля клеток этих двух линий не превышала 5% во всех экспериментальных группах (рис. 17).

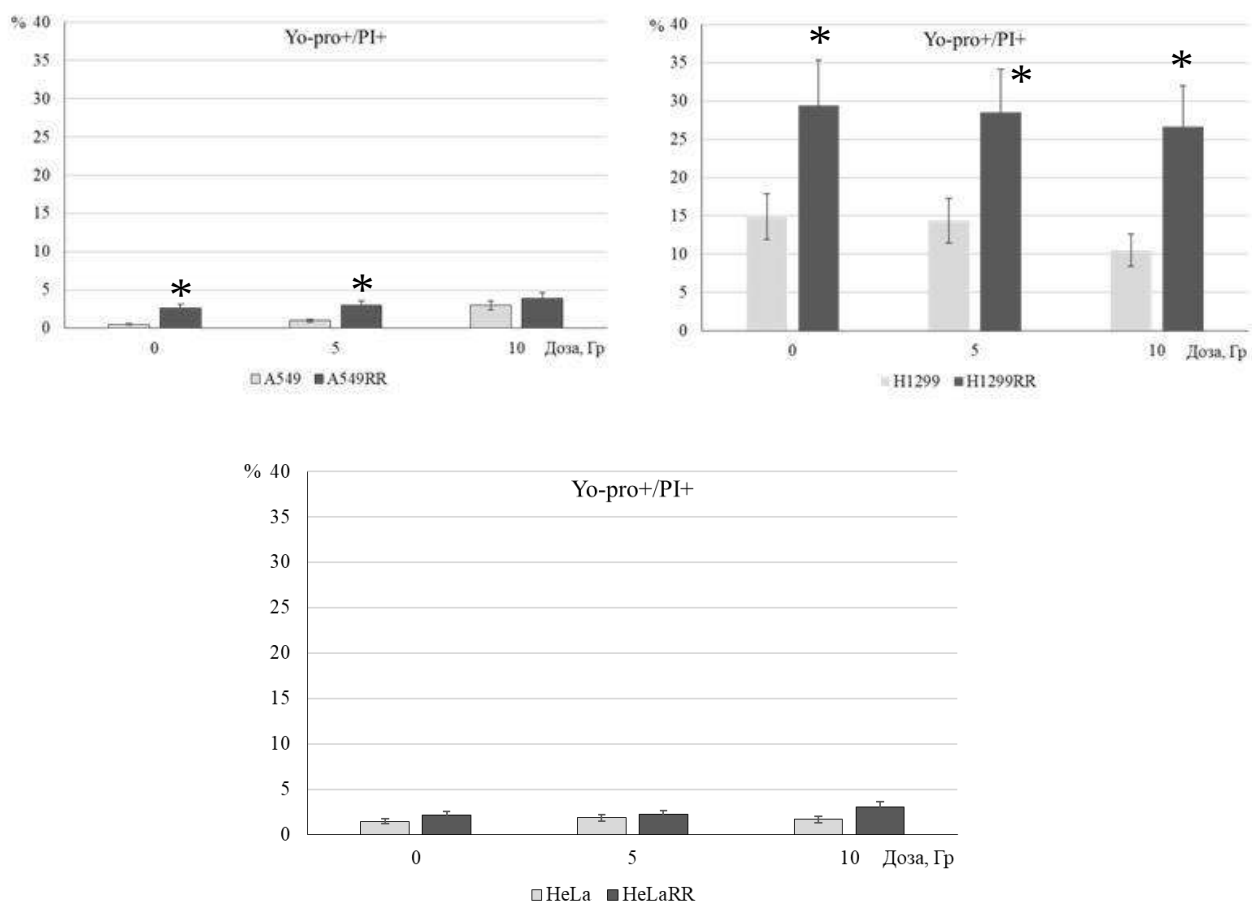


Рисунок 17 – Доля клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR в поздней стадии апоптоза спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр; * $p < 0,05$

Доля некротических клеток линии A549 достоверно увеличивалась с увеличением дозы облучения (рис. 18). В клетках линии A549RR достоверных различий в экспериментальных группах не наблюдалось. При этом доля облученных клеток, гибнущих по механизму некроза, была больше в линии A549, а в клетках без радиационного воздействия – в линии A549RR.

У клеточных линий H1299 и HeLa достоверных различий в доли некротических клеток после и без облучения выявлено не было, так же, как и у линий H1299RR и HeLaRR (рис. 18). Также наблюдается низкий уровень некротических клеток у линий H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR, который не превышал 10%.

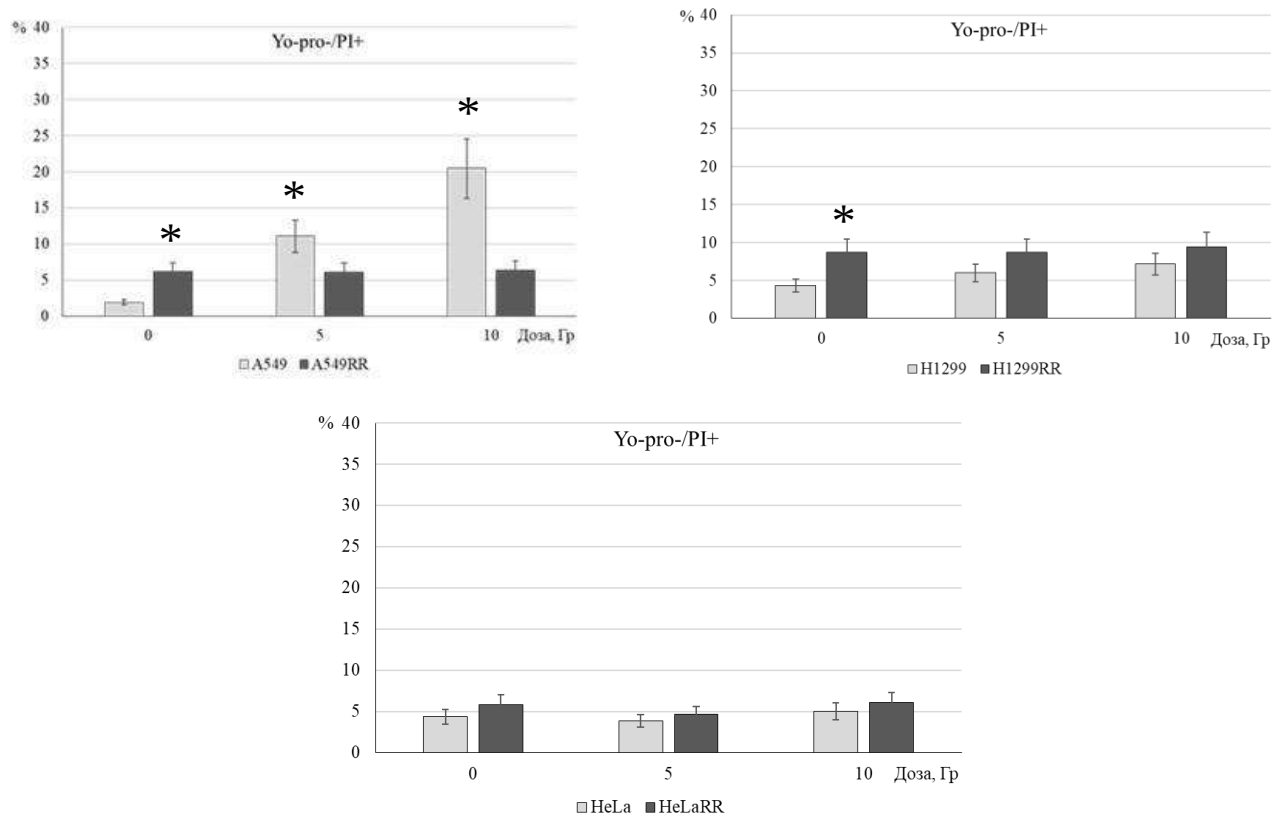


Рисунок 18 – Доля некротических клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0,05$

Анализ общей клеточной гибели показал увеличение доли погибших клеток A549 с увеличением дозы излучения (рис. 19). Клеточная линия A549RR демонстрировала стабильный уровень гибели независимо от радиационного воздействия, при этом показатели были достоверно ниже по сравнению с родительской линией A549 во всех экспериментальных группах. Напротив, в линии H1299RR наблюдалось значительное увеличение общего уровня клеточной гибели как без внешнего воздействия, так и после облучения в исследуемом диапазоне доз (5 и 10 Гр) относительно исходных клеток. Процент общей клеточной гибели клеток HeLa и HeLaRR увеличивался с дозой излучения, однако достоверных различий между исходными и выжившими клетками не наблюдали (рис. 19).

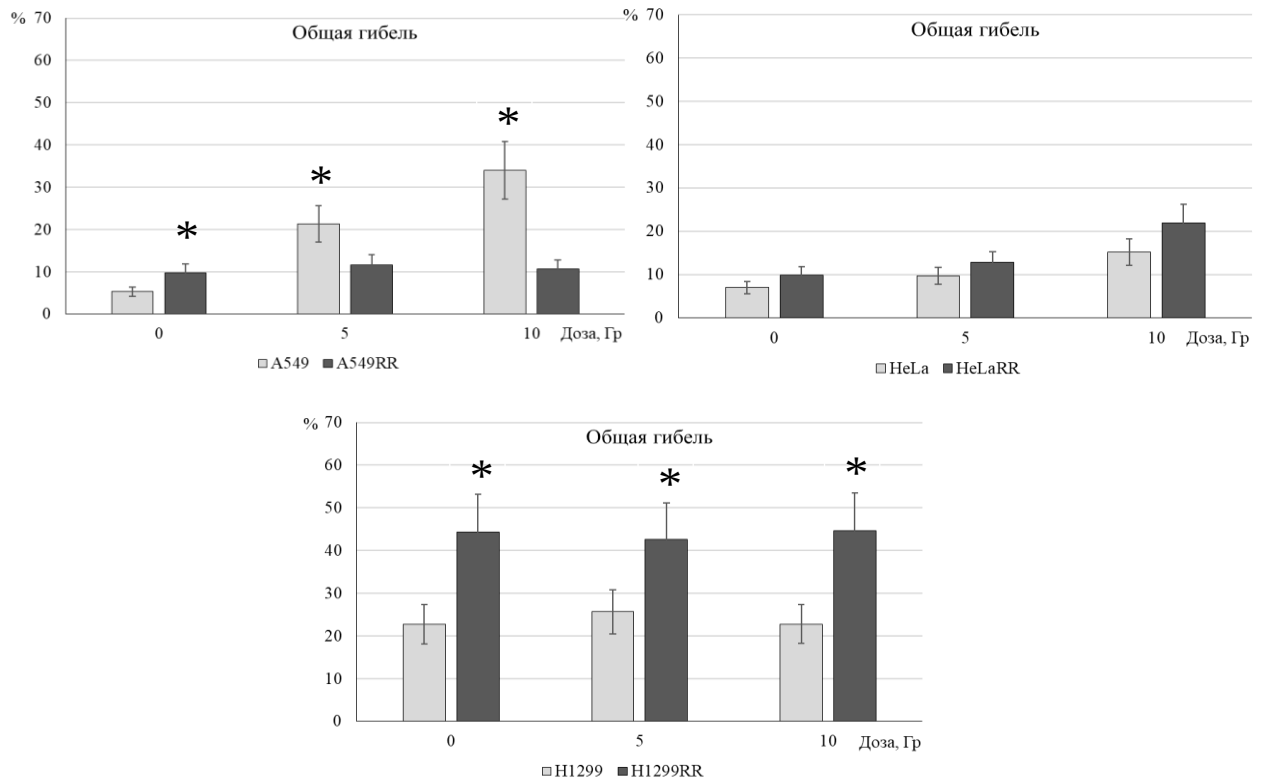


Рисунок 19 – Общая клеточная гибель в популяциях A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр; * $p < 0,05$

Полученные результаты согласуются с данными анализа пролиферативной активности изучаемых линий. Сравнение кривых роста клеток, дефицитных по p53, показали, что время удвоения популяции исходных клеток значительно ниже, чем у предварительно облученных в дозе 15 Гр. Полученные данные позволяют предположить, что замедление пролиферации в популяции клеток H1299RR в значительной степени обусловлено высоким уровнем клеточной гибели, достигающим ~45%. Следует отметить, что повышенная частота гибели клеток данной линии сохраняла стабильность даже после дополнительного радиационного воздействия в дозах 5 и 10 Гр.

3.4. Сравнительная оценка уровня остаточных фокусов репарации ДР ДНК у исходных и выживших опухолевых клеток человека

ДР ДНК являются одними из критически важных повреждений в клетке, определяют ее дальнейшую судьбу, поэтому количественный анализ этого показателя важен при изучении эффектов воздействия ионизирующих излучений. В настоящей работе мы количественно определяли остаточные, которые могут сохраняться длительное время, фокусы γ -H2AX. Они указывают либо на замедление процесса восстановления ДНК, либо на полное отсутствие репарации в связи с клеточным старением или апоптозом. В данном исследовании проводили сравнительную оценку уровня остаточных фокусов репарации ДР ДНК выживших (A549RR, HeLaRR, H1299RR) и исходных (A549, HeLa, H1299) клеток спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр. Через 24 часа после радиационного воздействия проводили иммуноцитохимическое окрашивание на фосфорилированную форму гистона H2AX (γ H2AX) – общепризнанный маркер данного типа повреждений.

Количественный анализ выявил статистически значимое снижение уровня остаточных ДР ДНК в клетках линии A549RR по сравнению с линией A549 после облучения в дозе 10 Гр (рис. 20). Полученные результаты позволяют предположить, что после воздействия в указанной дозе радиации, полученная нами клеточная линия A549RR действительно демонстрирует радиорезистентные свойства, проявляющиеся в меньшем количестве таких серьезных для выживания клетки повреждений генетического материала как ДР ДНК.

Количественный анализ остаточных фокусов повреждений ДНК выявил существенно меньшую частоту γ H2AX в линии HeLaRR относительно контроля при всех исследованных дозах облучения, что отражает высокую способность этих клеток к устранению радиационно-индуцированных повреждений генома (рис. 21).

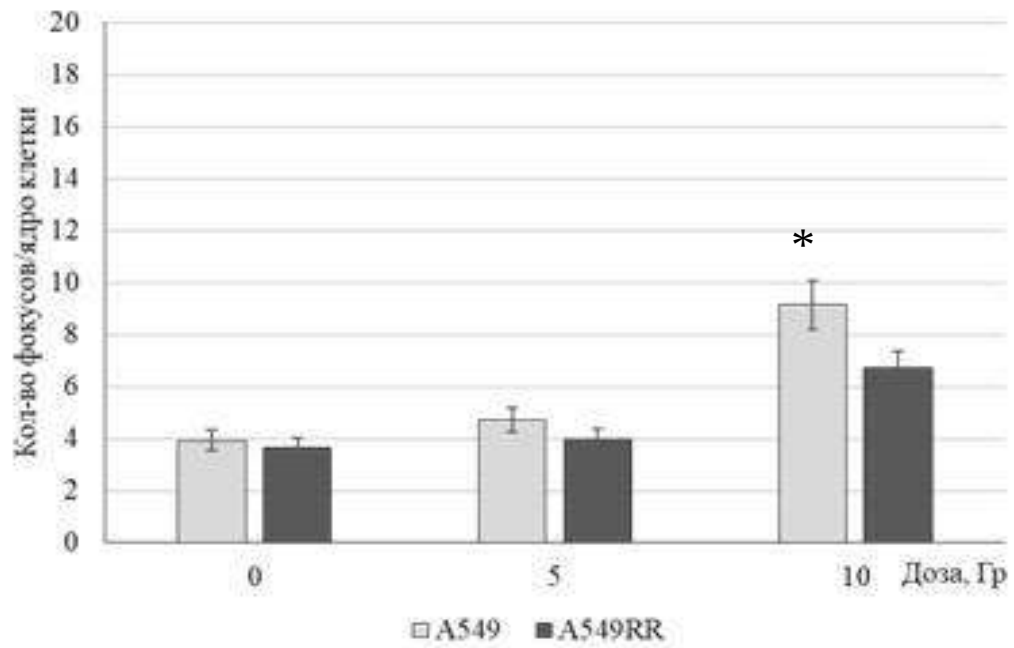


Рисунок 20 – Изменение количества остаточных фокусов γ H2AX линий A549 и A549RR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0.05$

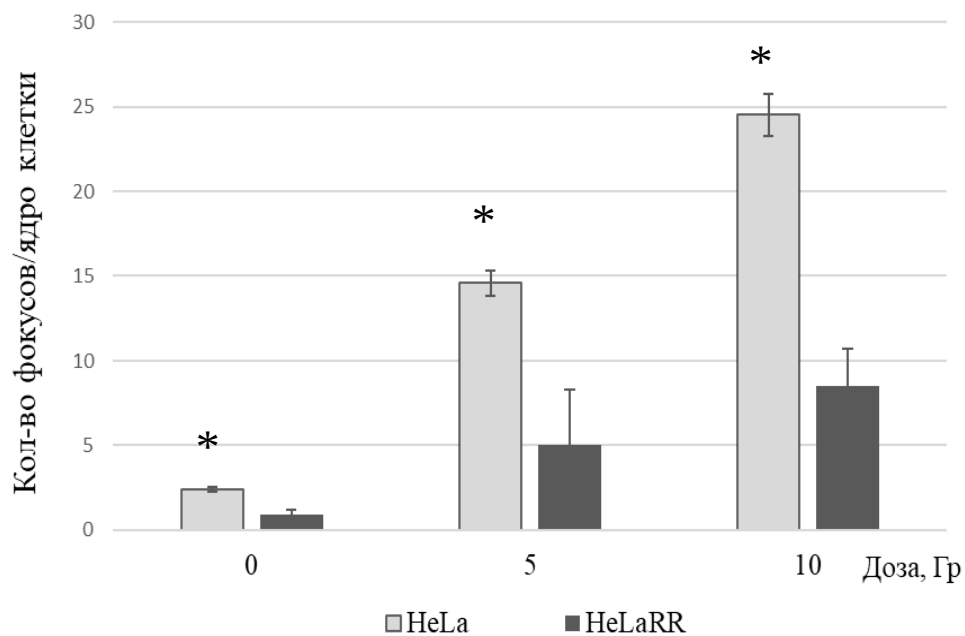


Рисунок 21 – Изменение количества остаточных фокусов γ H2AX линий HeLa и HeLaRR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0.05$

В линии клеток H1299 наблюдалось увеличение количества фокусов на ядро клетки после дополнительного облучения в сравнении с клетками, не подвергавшимися облучению, однако достоверных различий в количестве ДР ДНК в группах, облученных с разными дозами, 5 Гр и 10 Гр, выявлено не было (рис. 22). В клеточной линии H1299RR было показано достоверное увеличение числа фокусов на ядро клетки после облучения в дозе 10 Гр по сравнению с линией H1299.

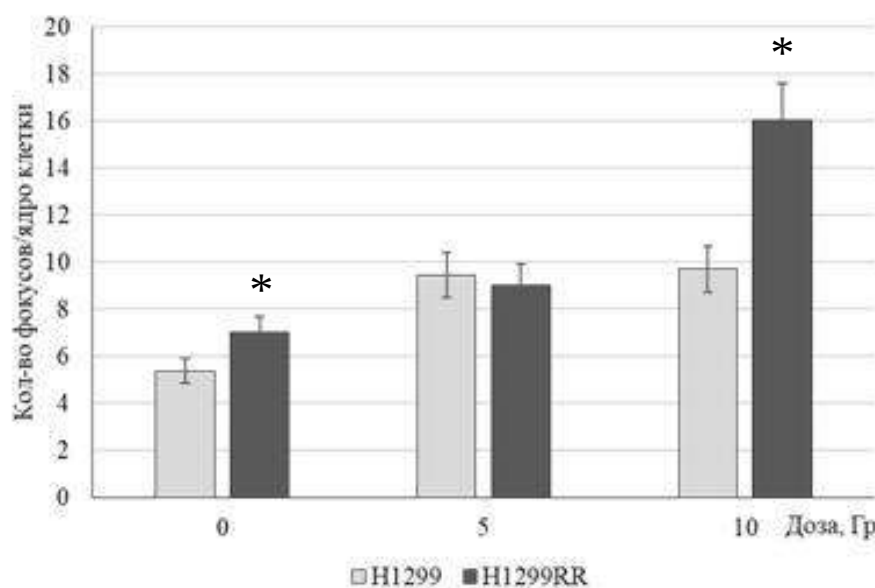


Рисунок 22 – Изменение количества остаточных фокусов γ H2AX линий H1299 и H1299RR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0,05$

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном снижении эффективности репарации ДНК в p53-дефицитных клетках после радиационного воздействия в дозе 10 Гр. Эти данные подтверждают критическую роль белка p53 в координации репарационных процессов при генотоксическом стрессе [85]. При сравнении p53wt и p53null клеточных линий, большее количество фокусов в дефицитных по белку p53 клетках связано с неэффективной репарацией ДР ДНК, что может привести к возникновению различных негативных изменений, включая и цитогенетические нарушения в клетке и может стать, как следствие, причиной ее гибели.

3.5. Цитогенетическая оценка исходных и выживших после облучения опухолевых клеток человека

В данной работе проводили микроядерный тест, широко используемый в биодозиметрии. Клетки всех изучаемых линий дополнительно облучали в дозах 5 Гр и 10 Гр на стадии их экспоненциального роста с плотностью популяции 70-80%. Сразу после облучения старую среду удаляли и добавляли новую с цитохалазином-Б на 22 часа, блокируя цитокinesis, с целью получения двоядерных клеток.

В исходных клетках A549 и HeLa было показано дозозависимое увеличение количества МЯ на двоядерную клетку, а у выживших A549RR и HeLaRR доля таких клеток после дополнительного воздействия была значительно ниже, чем у предварительно необлученных (рис. 23 и рис. 24).

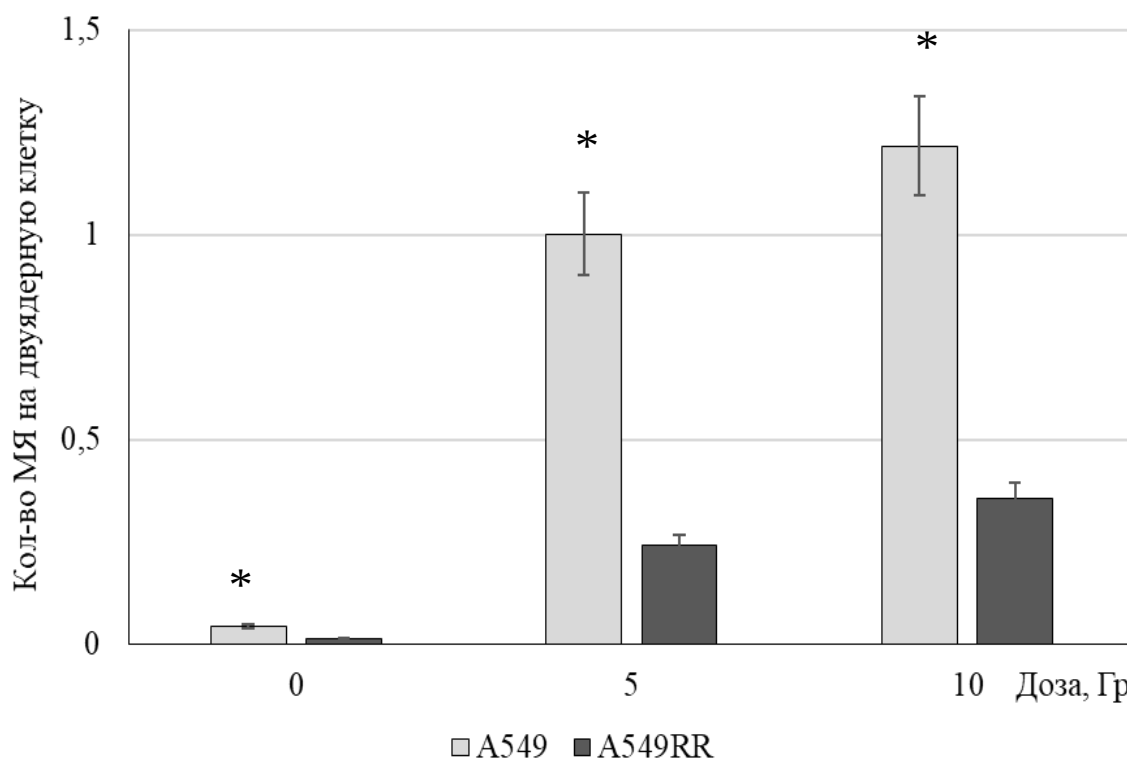


Рисунок 23 – Количество МЯ на двоядерную клетку A549 и A549RR без и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0,05$

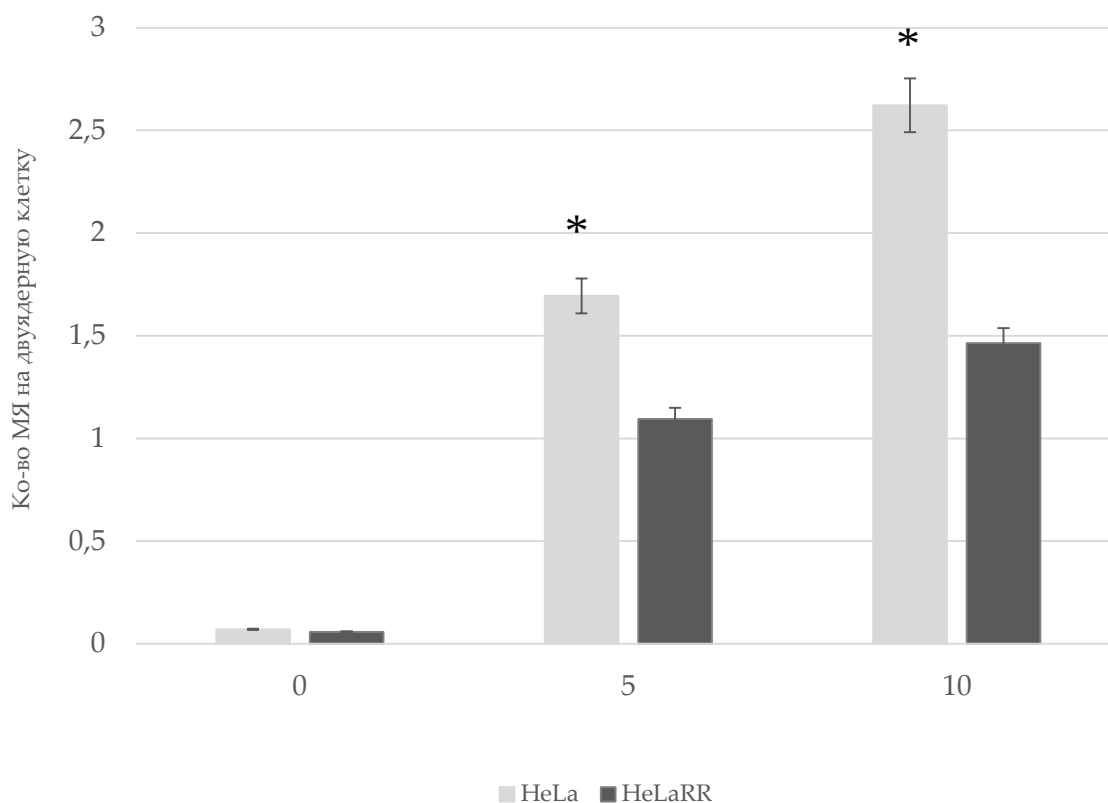


Рисунок 24 – Количество МЯ на двуядерную клетку HeLa и HeLaRR без и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0,05$

Клеточная линия H1299 демонстрировала стабильно низкий уровень образования микроядер (МЯ), не зависящий от дозы дополнительного облучения, что контрастировало с показателями линий A549 и HeLa. При этом в предварительно облученных клетках H1299RR зафиксирована парадоксальная дозовая зависимость – достоверно более высокая частота МЯ после облучения в дозе 5 Гр по сравнению с воздействием 10 Гр (рис. 25). Учитывая результаты, описанные выше, можно предположить, что низкий уровень МЯ в этих клетках после облучения в дозе 10 Гр связан преимущественно с высоким уровнем их гибели.

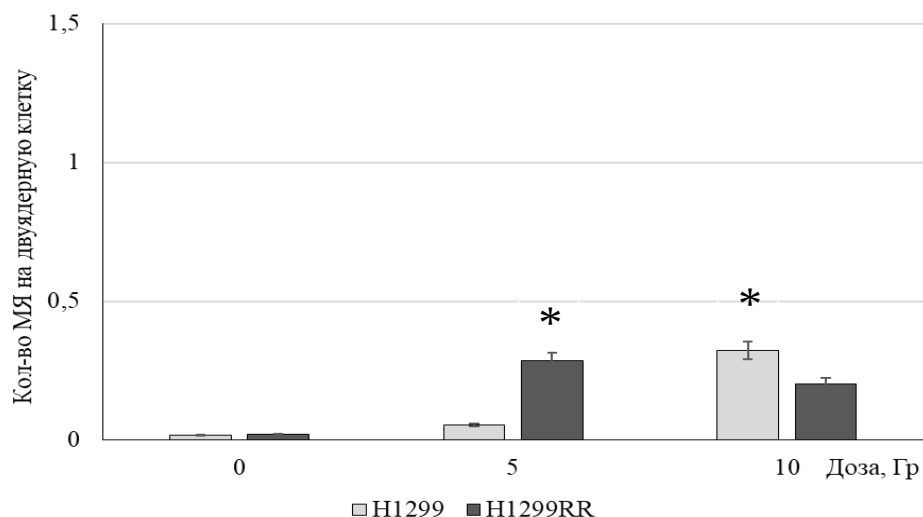


Рисунок 25 – Количество МЯ на двуядерную клетку H1299 и H1299RR без и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

* $p < 0,05$

Также было проведено сравнение долей клеток как без, так и содержащих 1, 2, 3, более 3 МЯ.

При сравнении данных, полученных на клетках линий A549 и A549RR, было показано увеличение доли клеток без МЯ в A549RR в обеих тестовых группах, подвергавшихся облучению (рис. 26). Примерно такую же зависимость можно наблюдать и у линий H1299 и H1299RR, у которых доля клеток без МЯ оставалась значительно высокой во всех трех экспериментальных группах (рис. 26). Касаясь клеток HeLa и HeLaRR, то в каждой клеточной линии наблюдается увеличение доли клеток, содержащих 1, 2, 3 и более 3 МЯ во всех трех экспериментальных группах по сравнению с A549 и A549RR, H1299 и H1299RR, и даже наблюдается резкий скачок по количеству клеток линии HeLa содержащих более 3 МЯ после дополнительного облучения в дозе 10 Гр (рис. 26).

Образование микроядер в пролиферирующих клетках отражает наличие хромосомных aberrаций, возникающих вследствие образования ацентрических фрагментов или потери целых хромосом в анафазе, что является как прямым следствием неполноценной репарации двунитевых разрывов ДНК, так и нарушением целостности веретена деления.

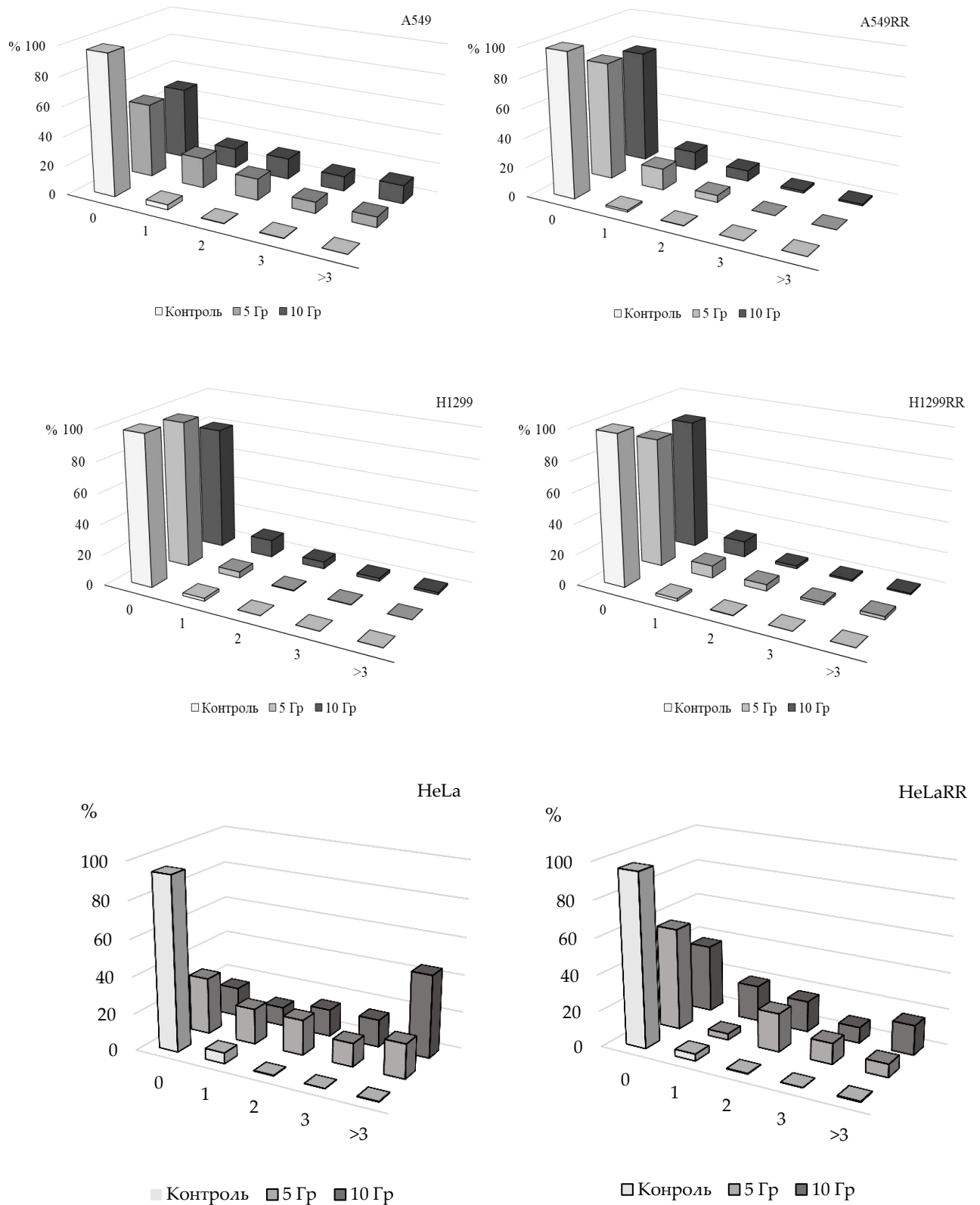


Рисунок 26 – Доли клеток, содержащих 1, 2, 3, более 3 МЯ и не содержащих МЯ в клеточных линиях A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299, H1299RR без облучения и после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр

Наблюдаемый феномен, вероятно, объясняется селективным выживанием клеток с повышенной репарационной способностью, тогда как клетки с невосстановленными повреждениями (фиксируемыми как остаточные γ H2AX-фокусы) подвергаются в дальнейшем элиминации.

Более низкий выход уровня МЯ в группах клеток H1299 и H1299RR, по всей видимости, можно объяснить менее выраженной гетерогенностью по количеству хромосом по сравнению с клетками линии A549. Известно, что один из механизмов формирования МЯ – это выпадение из метафазного аппарата целых хромосом при неблагоприятных воздействиях.

К сожалению, в литературе практически не встречается исследований по количественному анализу клеток с различным количеством МЯ. Очевидно, что гетерогенность опухолевых клеток по количеству хромосом затрудняет интерпретацию полученных данных. Поэтому важным аспектом является определение связи между формированием МЯ в опухолевых клетках в ответ на облучение и индукции их гибели. Так, в работе [155] анализировали корреляцию между клиническим исходом и чувствительностью опухолевых клеток к облучению. Выявлена очень низкая корреляция ($r=0,324$) между частотой микроядер в клетках, облученных *in vitro* и *in vivo*, однако были использованы дозы при стандартном фракционировании. Показано, что оценка прироста частоты микроядер во время лучевой терапии (суммарная очаговая доза 20 Гр) предлагает потенциально ценный подход к прогнозированию индивидуальной радиочувствительности и может быть полезна для индивидуализации стратегии лечения рака шейки матки на поздней стадии.

В нашем исследовании имеется связь между уровнем МЯ и гибелью клеток A549 и A549RR (рис. 23 и 19), однако для других исследованных линий эта взаимосвязь не выявлена.

Таким образом, в выживших клетках A549RR и HeLaRR наблюдаются более низкие показатели выхода цитогенетических нарушений после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр. Клетки линий H1299 и H1299RR имеют значительно более низкие показатели по выходу МЯ во всех

экспериментальных группах, что мы связываем со значительной элиминацией клеток с МЯ.

3.6. Оценка репродуктивной гибели исходных и выживших опухолевых клеток человека после рентгеновского облучения в различных дозах

При проведении анализа клоногенной способности было выявлено, что предварительно облученные клетки всех трех групп проявили лучшую выживаемость после дополнительного облучения, чем их исходные клетки (за исключением клеток HeLa при дополнительной дозе облучения 6 Гр).

Согласно данным, представленным на рисунке 27, клетки линии A549RR характеризуются более высокой репродуктивной жизнеспособностью после дополнительного радиационного воздействия в дозах 2 и 4 Гр по сравнению с родительской линией A549.

Кривые репродуктивной выживаемости клеток HeLa и HeLaRR демонстрируют существенные отличия от других исследуемых линий. Наибольшая радиочувствительность наблюдается при дозе 6 Гр, что проявляется максимальным уровнем репродуктивной гибели. При этом предварительно облученные клетки HeLaRR показывают статистически значимо более высокую выживаемость после облучения в дозе 2 Гр по сравнению с родительской линией (рис. 27).

Клеточные p53-дефицитные линии H1299 и H1299RR демонстрируют высокие показатели по выживаемости в сравнении с другими исследуемыми линиями при всех тестируемых дозах облучения (рис. 27). По нашему мнению, этот феномен обусловлен следующими ключевыми факторами: сохранением высокого пролиферативного потенциала, отсутствием p53-зависимых остановок клеточного цикла, эффективной элиминацией поврежденных клеток, ускоренной селекцией радиорезистентных клеток.

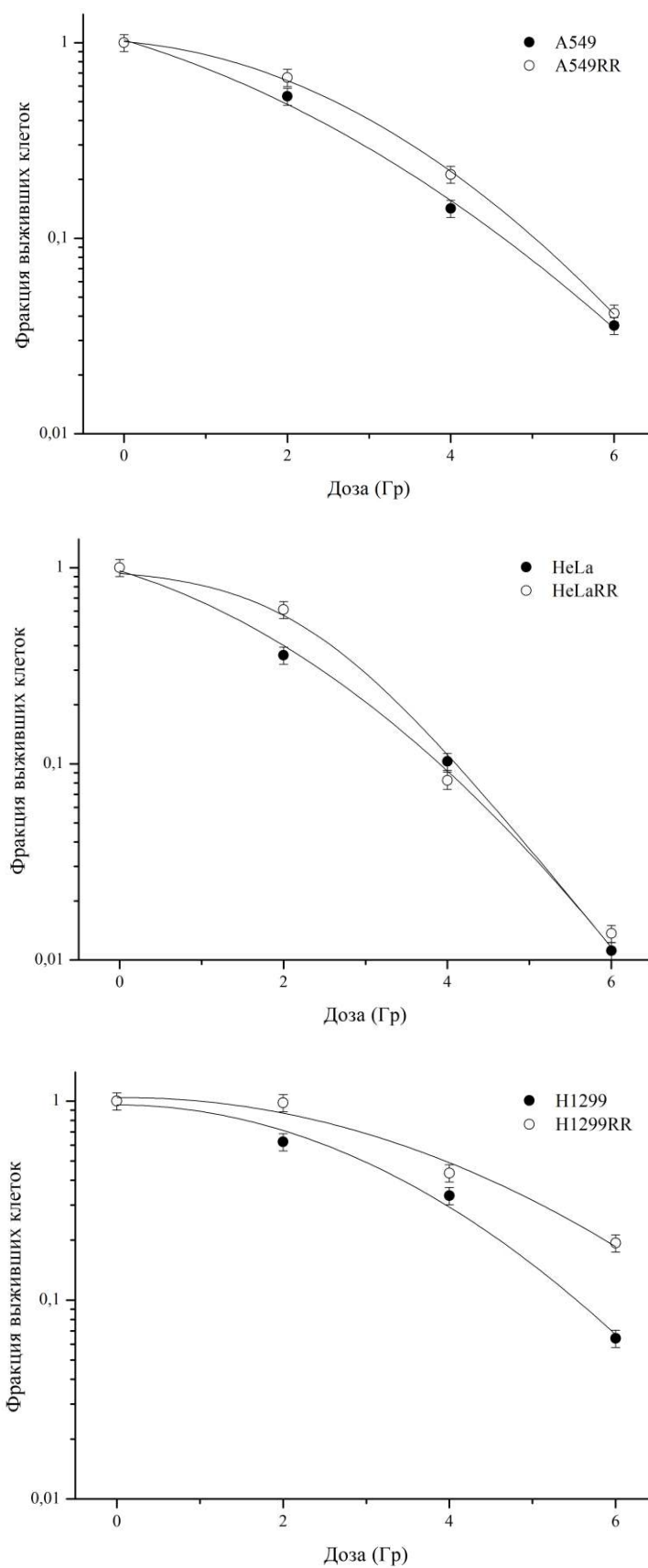


Рисунок 27 – Клоногенная выживаемость A549, A549 RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR, после дополнительного облучения в дозах 2 Гр, 4 Гр и 6 Гр

Кинетика клеточной выживаемости после рентгеновского облучения описывается линейно-квадратичным уравнением (ЛКУ) (формула 3):

$$SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}, \quad (3)$$

где SF – фракция выживших клеток, а D – доза излучения [156].

В данном уравнении:

- Параметр α отражает вероятность гибели клетки от одиночного летального повреждения;
- Параметр β характеризует кумулятивный эффект множественных сублетальных повреждений.

Сравнительный анализ соотношений α/β для различных клеточных линий выявил существенные различия в радиочувствительности (Таблица 2):

- Исходные линии A549 и HeLa показали более высокие значения (5,67 и 7,69 соответственно);
- Выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки A549RR и HeLaRR имеют низкие показатели (0,99 и 3,12);
- У клеток H1299RR более высокие значения по сравнению с исходными клетками H1299 (0,19 и 0,01 соответственно).

Анализ коэффициентов α/β указывает на устойчивость клеток A549RR и HeLaRR к радиационному воздействию в отличие от их исходных форм. Примечательно, что обе исследуемые линии H1299 (исходная и предварительное облученная) изначально демонстрируют высокую устойчивость к действию рентгеновского излучения.

Согласно литературным данным [156], характерные значения соотношения α/β демонстрируют существенные различия между опухолевыми и нормальными тканями:

- Опухолевые клетки: 5-20 Гр (среднее 10 Гр);
- Немелкоклеточный рак легкого: до 60 Гр;
- Позднореагирующие нормальные ткани: 1-4 Гр (среднее 2,5 Гр).

Таблица 2 – Значения ЛКУ для линий A549, A549 RR, HeLa, HeLaRR H1299 и H1299RR

Параметр	A549	A549RR	HeLa	HeLaRR	H1299	H1299RR
α/β	5,67	0,99	7,69	3,12	0,01	0,19
D_q	1,89	2,63	1,67	2,21	2,91	3,19
D_0	1,19	1,04	1,06	0,84	1,15	1,62
n	4,83	12,28	4,76	13,55	12,29	7,11

Наши исследования показывают, что предварительно облученные клетки A549RR и HeLaRR, а также p53-дефицитные клетки линии H1299 и H1299RR обладают повышенной устойчивостью к рентгеновскому излучению в исследованном диапазоне доз (2, 4 и 6 Гр).

3.7. Сравнительная оценка миграционной активности клеток с помощью теста на заживление «раны» («скретч-тест»)

Сравнительный анализ миграции выживших после облучения в дозе 15Гр и исходных опухолевых клеток после облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр анализировали в течение 48 часов с помощью оценки скорости заживления «раны», или скретч-теста.

Клетки A549 обладают высокой миграционной активностью и без дополнительного облучения уже за 24 часа закрывают «рану» на ~80% (рис. 28А). С увеличением дозы облучения активность снижается, особенно ярко это выражено после облучения в дозах 4 и 6 Гр и к 24 часам «рана» полностью не заживает (рис. 28В, Г), тогда как у клеток A549RR скорость заживления «раны» была значительно выше в течение 24 часов как в контроле, так и после облучения во всех использованных дозах.

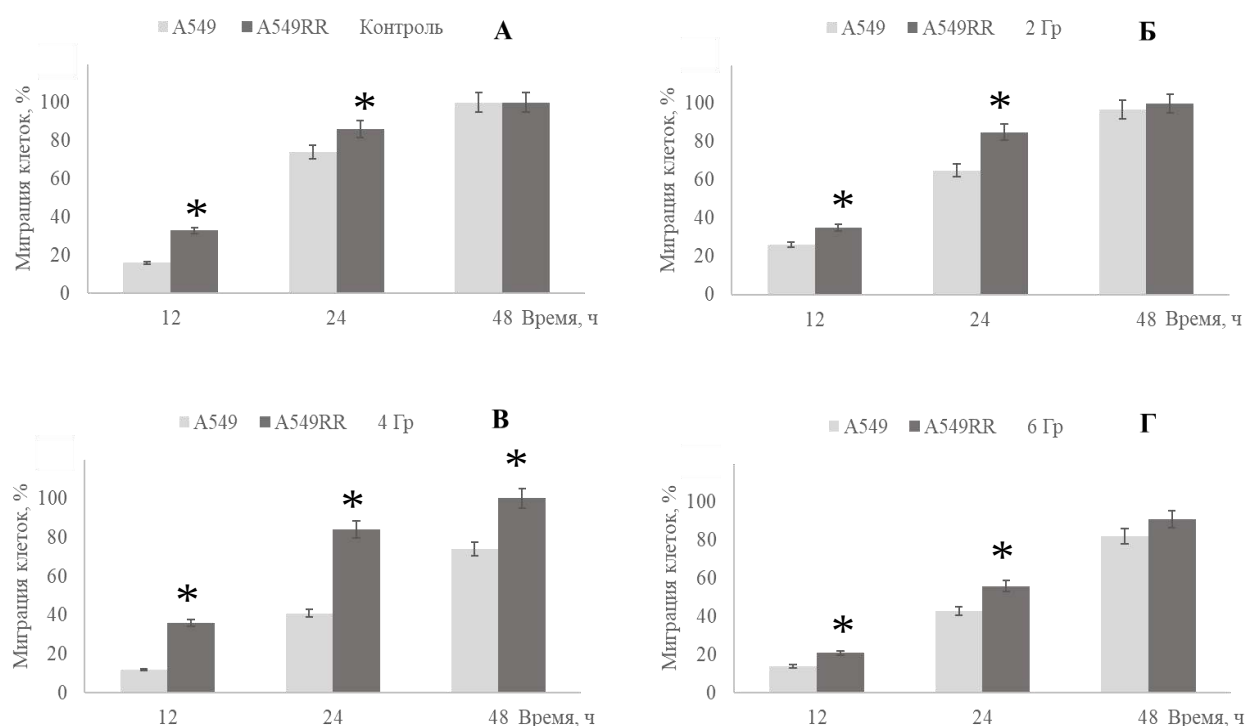


Рисунок 28 – Миграционная активность клеток A549, A549RR, спустя 12 ч, 24 ч и 48 ч после дополнительного облучения в дозах 2 Гр, 4 Гр и 6 Гр

* $p < 0,05$

Также после облучения в дозе 4 Гр спустя 48 часов миграционная активность клеток A549RR сохранялась на высоком уровне и была значительно выше, чем у исходных клеток (рис. 28В). Следует отметить, что время удвоения клеточной популяции A549RR, как было отмечено выше, значительно превышает этот показатель исходных клеток, следовательно, высокие показатели теста заживления «раны» свидетельствуют об индукции миграционной активности этих клеток и после дополнительного облучения это свойство сохраняется.

Клетки линии HeLaRR демонстрируют стабильно высокий уровень миграционной активности как без радиационного воздействия, так и после облучения в дозах 2 и 4 Гр (рис. 29А-В). Однако после облучения в дозе 6 Гр наблюдаем обратную картину: исходные клетки HeLa проявляют более высокую миграционную активность по сравнению с HeLaRR.

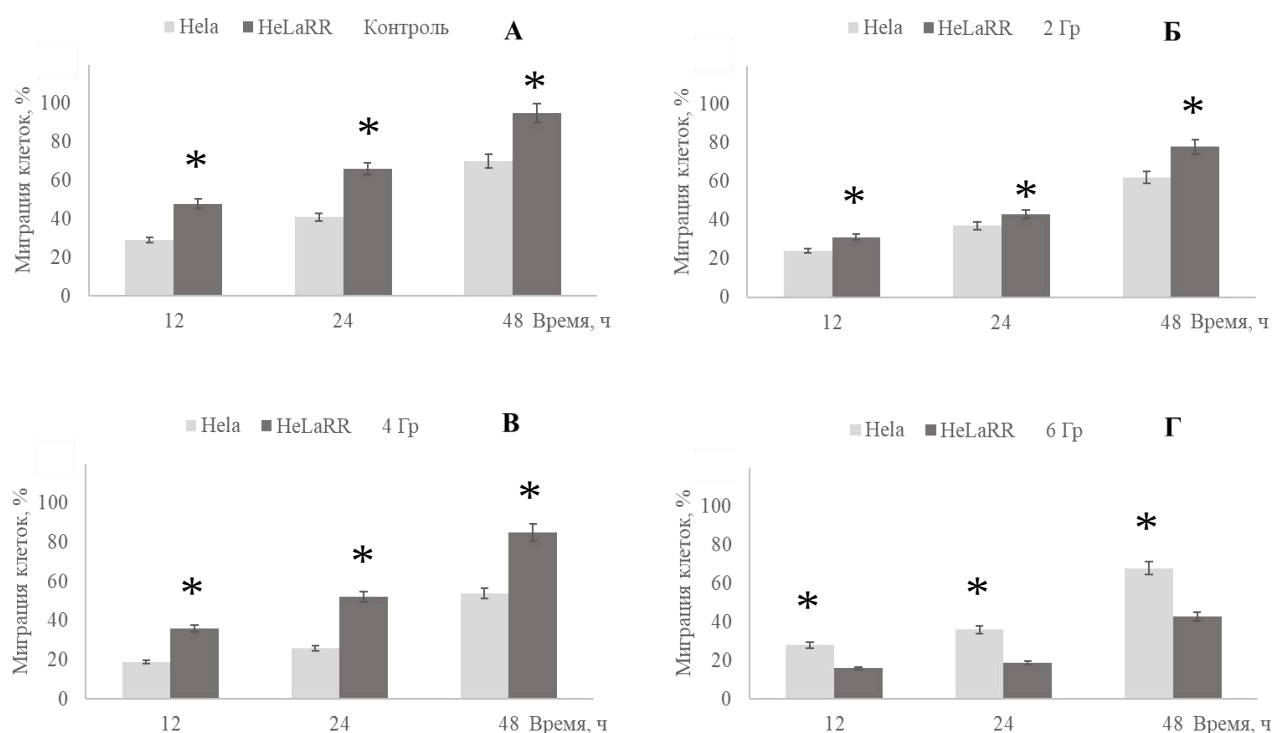


Рисунок 29 – Миграционная активность клеток HeLa и HeLaRR, спустя 12 ч, 24 ч и 48 ч после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр

* $p < 0,05$

Аналогично клеткам A549RR, популяция HeLaRR характеризуется увеличенным временем удвоения по сравнению с клетками исходной линии, что коррелирует с индукцией миграционной активности у клеток, выживших после острого облучения в дозе 15 Гр. Данное свойство сохраняет свою выраженность при последующем облучении в дозах 2 и 4 Гр, однако воздействие в дозе 6 Гр приводит к значительному подавлению миграционной активности в этих клетках (рис. 29Г). Полагаем, что увеличение дозы облучения будет значительно подавлять миграционную активность выживших после облучения в дозе 15 Гр клеток HeLaRR и выбор более высоких доз повторного облучения в этом случае оправдан.

Сравнительная оценка миграционного потенциала клеточных линий H1299 и H1299RR не выявила статистически значимых различий между ними. В обеих исследуемых группах наблюдалось полное закрытие «раны» в течение 48-

часового интервала наблюдения как в условиях отсутствия облучения, так и после радиационного воздействия в дозах 2, 4 и 6 Гр (рис. 30).

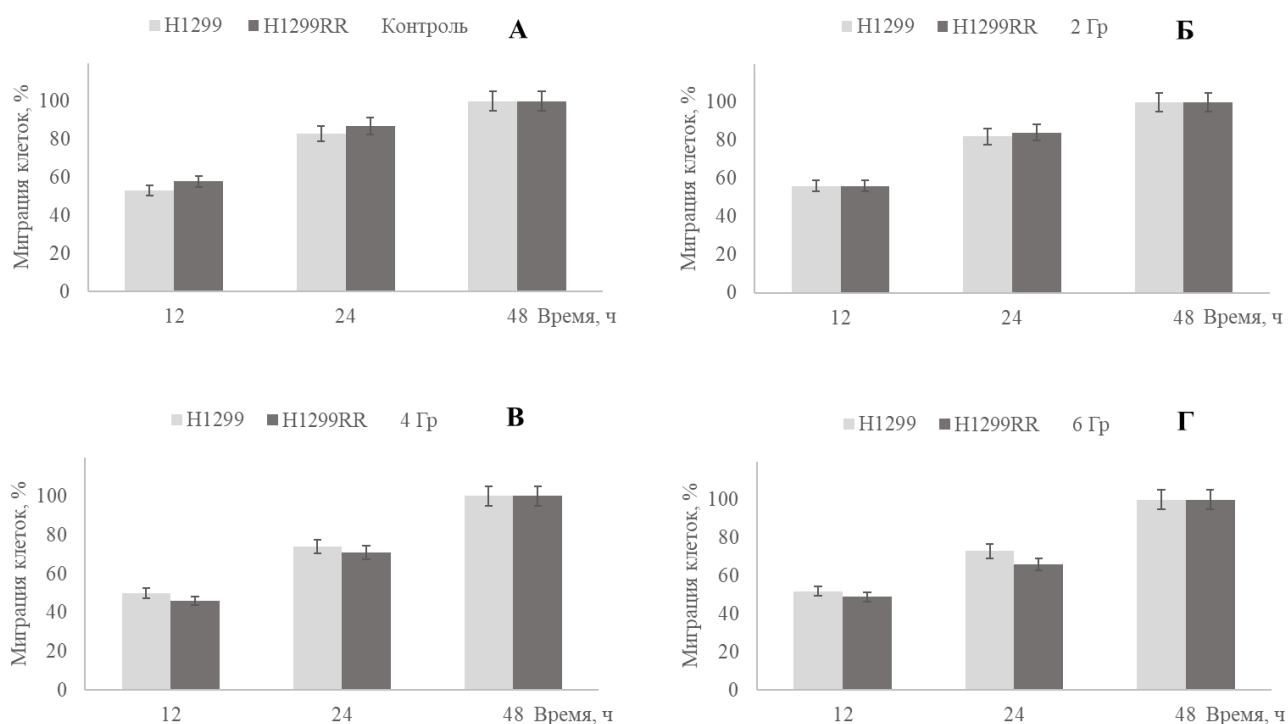


Рисунок 30 – Миграционная активность клеток H1299 и H1299RR спустя 12, 24 и 48 ч после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр

Результаты исследования свидетельствуют о том, что клеточные линии немелкоклеточного рака легкого с дефицитом p53 демонстрируют стабильно высокие показатели миграционной активности и выживаемости после радиационного воздействия в диапазоне доз 2-6 Гр, независимо от наличия предварительного облучения. Эта выраженная радиорезистентность создает существенные трудности для эффективной терапии данного типа опухолей, значительно превосходя аналогичные показатели клеточных моделей немелкоклеточного рака легкого и аденокарциномы шейки матки с сохраненной функцией p53. Точное определение вклада p53 в наблюдаемые процессы представляет собой перспективное направление для последующих экспериментальных работ.

Проведенный анализ выявил, что клетки немелкоклеточного рака легкого и аденокарциномы шейки матки, после острого облучения в дозе 15 Гр характеризуются не только замедленной пролиферацией (по данным времени удвоения популяции), но и разнонаправленными изменениями миграционной активности как в контрольных условиях, так и после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр. Клетки A549RR имеют высокий потенциал миграции вплоть до облучения до 6 Гр. Клетки HeLaRR также обладают высокой миграционной активностью вплоть до облучения в дозе 4 Гр, а облучение в дозе 6 Гр ингибирует эту активность. Миграционная активность p53-дефицитных клеток H1299 остается стабильно высокой при любых вариантах радиационного воздействия, включая предварительное облучение 15 Гр и последующие дополнительные воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в проведенных исследованиях выявлено, что острое облучение в дозе 15 Гр формирует пул клеток, имеющих отличия от исходных клеток. У всех исследованных выживших после облучения опухолевых клеток человека отмечено увеличение времени удвоения клеточной популяции. По маркеру клеточной пролиферации Ki-67 выявлено, что количество Ki-67-позитивных клеток A549 и HeLa было значительным (~80-95%) и не отличалось от этого показателя у выживших после острого облучения в дозе 15 Гр клеток A549RR и HeLaRR. Количество Ki-67-позитивных клеток H1299 (p53-дефицитные) составило ~50%, а у выживших H1299RR – достоверно выше. Следовательно, ~50% исходных клеток H1299 в популяции находились в стадии G0. После дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр у клеток A549 и A549RR наблюдали дозозависимое снижение количества пролиферирующих клеток. После облучения в дозе 10 Гр процент пролиферирующих клеток A549RR был значительно ниже исходных клеток. Количество пролиферирующих клеток HeLa оставалось на высоком уровне (~95-100%), от дозы облучения не зависело и различий между клетками HeLa и HeLaRR не выявлено. Отмечено снижение количества пролиферирующих клеток H1299 после дополнительного облучения в дозе 10 Гр, тогда как у выживших после облучения в дозе 15 Гр клеток H1299RR процент активно пролиферирующих клеток был значительно выше.

Цитофлуориметрический анализ распределения по фазам клеточного цикла выявил существенные различия между клетками линий A549 и A549RR. В контрольных условиях популяция A549 характеризовалась доминированием G1-фазы ~80%, тогда как в линии A549RR после острого облучения в дозе 15 Гр преобладали клетки G2/М-фазы ~60% при относительно низком содержании G0/G1-клеток ~40%. Дозозависимый анализ показал динамическое перераспределение фаз: после дополнительного воздействия 5 Гр в линии A549RR отмечалось значительное увеличение доли G0/G1-клеток, тогда как после дозы 10 Гр наблюдалось балансирование между G0/G1 и G2/М-фазами.

Параллельно регистрировалось прогрессирующее снижение популяции S-фазы, достигающее минимума при дозе 10 Гр.

Анализ распределения по фазам клеточного цикла в линии HeLa не выявил значимых изменений при дополнительном облучении в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с контролем. У предварительно облученных клеток HeLaRR увеличение доли клеток в G2/M-фазе наблюдалось исключительно после воздействия дозой 5 Гр.

Для линий H1299 и H1299RR характерна дозозависимая динамика: с ростом дозы облучения отмечается увеличение популяции клеток в G2/M-фазе при параллельном снижении доли клеток в G0/G1-фазе.

При анализе общей гибели исследуемых опухолевых клеток выявлено, что у клеток A549RR и H1299RR достоверно высокий процент гибели по сравнению с исходными клетками без дополнительного воздействия. Это указывает на основную причину увеличения времени удвоения этой популяции по сравнению с исходными, предварительно не облученными клетками. Увеличение времени удвоения у клеток HeLaRR, по всей видимости, на основании данных по пролиферации, связано с увеличением продолжительности стадий клеточного цикла. Высокий процент гибели отмечен у исходных клеток A549 по сравнению с A549RR после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр. В клеточных популяциях HeLa и HeLaRR процент гибели незначительно возрастал с увеличением дозы дополнительного воздействия, но различий между этими клетками не было выявлено. В клеточной популяции H1299RR выявлен значительный процент погибших клеток как без дополнительного воздействия, так и после облучения в дозах 5 и 10 Гр, причем уровень погибших клеток был примерно одинаков.

Количественный анализ остаточных фокусов репарации ДР ДНК выявил сниженные показатели в линии HeLaRR как в контрольных условиях, так и после дополнительного облучения (5 и 10 Гр), а у линии A549RR - только при дозе 10 Гр. Напротив, клетки линии H1299RR демонстрировали повышенные значения

данного параметра относительно исходной линии как в контроле, так и после облучения в дозе 10 Гр.

Цитогенетический анализ частоты МЯ показал достоверно меньшее их образование в линиях A549RR и HeLaRR после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с исходными клетками. В линиях H1299 и H1299RR не наблюдали четкой дозовой зависимости, однако выявлены специфические эффекты: максимальный уровень МЯ в H1299RR после облучения в дозе 5 Гр и в H1299 после 10 Гр.

При анализе репродуктивной гибели клеток с применением клоногенного теста установлено, что выжившие после острого облучения опухолевые клетки всех трех экспериментальных групп обладают более успешной выживаемостью по сравнению с исходными клетками.

Результаты, полученные по оценке миграционной активности клеток после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр, свидетельствуют, что клетки A549RR имеют высокую степень миграции вплоть до облучения до 6 Гр. Клетки HeLaRR также обладают высокой миграционной активностью вплоть до облучения в дозе 4 Гр, а облучение в дозе 6 Гр ингибирует эту активность. Миграционная активность p53-дефицитных клеток H1299 остается стабильно высокой при любых вариантах радиационного воздействия, включая предварительное облучение 15 Гр и последующие дополнительные радиационные воздействия.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют как о сходстве, так и о различиях в сформированных выживших популяциях различных опухолевых клеток после однократного облучения в большой дозе рентгеновского излучения, так же, как и их реакции на дополнительное радиационное воздействие в широком диапазоне доз. Данное исследование позволяет оценить возможности изменения стратегии в стереотаксической лучевой терапии при лечении некоторых видов злокачественных новообразований. Так, например, выжившие после облучения высокой дозой клетки аденокарциномы шейки матки (HeLa) сохраняют возможность

пролиферации, миграции, более эффективно репарируют ДР ДНК и т. п., но с увеличением дозы повторного облучения значительно снижается их миграционный потенциал, что делает возможным подбор такой дозы облучения, при котором эта возможность нивелируется. Для клеток немелкоклеточного рака легких такой подход менее оправдан, выжившие клетки более устойчивы. Для p53-дефицитных клеток с нарушениями регуляции клеточного цикла и индукции апоптоза и т. п. в данном исследовании показаны результаты очень хорошей выживаемости и миграционной способности даже после дополнительного облучения в больших дозах, поэтому выбор стратегии лечения должен быть иным с учетом изученных особенностей этих клеток. Так или иначе, проведенные исследования являются частью большой работы, направленной на изучение механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к радиационному воздействию в широком диапазоне доз и поиск возможных путей ее преодоления.

ВЫВОДЫ

1. Были получены и охарактеризованы выжившие клетки линий A549, HeLa и H1299 (A549RR, HeLaRR и H1299RR) после острого воздействия рентгеновским излучением в дозе 15 Гр.

2. У выживших после облучения опухолевых клеток человека отмечено увеличение времени удвоения клеточной популяции на фоне изменения распределения по фазам клеточного цикла и клеточной гибели. У клеток A549RR и HeLaRR за счет увеличения времени прохождения стадий клеточного цикла, у H1299RR за счет большого количества гибнущих клеток.

3. Показано дозозависимое снижение пролиферативной активности по белку Ki-67 в клетках линии A549 (на 39,5%) и A549RR (на 50%), тогда как в p53-дефицитных клетках H1299 и H1299RR такой зависимости не наблюдали и в клетках H1299RR сохранялась высокая пролиферативная активность (~70%).

4. Установлен высокий процент погибающих клеток H1299RR по сравнению с исходными без дополнительного воздействия и после облучения в дозах 5 и 10 Гр. Высокий процент гибели отмечен у исходных клеток A549 по сравнению с A549RR после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр. HeLa и HeLaRR процент гибели незначительно возрастал с увеличением дозы дополнительного воздействия, но различий между этими клетками не было выявлено.

5. Отмечен низкий уровень остаточных фокусов γ H2AX в клетках A549RR после облучения в дозе 10 Гр по сравнению с исходными. Также наблюдали значительное снижение этого показателя у клеток линии HeLaRR как без воздействия, так и после дополнительного воздействия в дозах 5 и 10 Гр, что свидетельствует о селекции клеток с более эффективной репарацией повреждений ДНК после острого облучения в дозе 15 Гр. У выживших после облучения в дозе

15 Гр клеток H1299RR фиксировали значительное увеличение количества остаточных фокусов γ H2AX после дополнительного облучения в дозе 10 Гр.

6. Наряду с остаточными фокусами репарации ДР ДНК, выявлено и значительное снижение уровня МЯ в клетках A549RR и HeLaRR по сравнению с исходными клетками после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр. В p53-дефицитных клетках H1299RR наблюдали значительное повышение (по сравнению с исходными клетками) количества МЯ после дополнительного облучения в дозе 5 Гр.

7. Клоногенный тест выживших после острого облучения в дозе 15 Гр клеток A549RR, HeLaRR и H1299RR выявил более высокую, по сравнению с исходными клетками, устойчивость к дополнительному облучению в дозах 2, 4 и 6 Гр.

8. Миграционная активность клеток, являющаяся одним из ключевых факторов метастазирования опухоли, существенно высока у клеток A549RR в течение 24 часов после облучения в дозе 2 и 6 Гр и в течение 48 часов после облучения в дозе 4 Гр. У клеток HeLaRR миграционная активность была значительно выше как без, так и после облучения в дозах 2 и 4 Гр, однако облучение в дозе 6 Гр ингибирует их миграционную активность, что может быть учтено при планировании лучевой терапии аденокарциномы шейки матки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК** – Активная форма кислорода
- ДР** – Двунитевые разрывы
- ММП** – Митохондриальный мембранный потенциал
- МО** – Микроокружение опухоли
- МФО** – Многофракционное облучение
- МЯ** – Микроядро
- ОР** – Однонитевые разрывы
- ОСК** – Опухолевые стволовые клетки
- ПК** – Пируваткиназа
- ПФП** – Пентозофосфатный путь
- ХЛТ** – Химиолучевая терапия
- ЭМП** – Эпителиально-мезенхимальный переход
- 2-DG** – 2-дезоксид-Д-глюкоза
- Araf -1** – Апоптотическая протеаза-1
- АТМ** (англ. ataxia telangiectasia mutated) – серин/треониновая протеинкиназа, мутация по которой вызывает заболевание – атаксия телеангиэктазия
- CDK** – Циклинзависимая киназа
- DNA-PKcs** – ДНК-протеинкиназа
- HIF1** – Гипоксический индуцибельный фактор 1
- HK2** – Гексокиназа 2
- MAPK** – Митоген-активированная протеинкиназа
- NPC** – Карциномы носоглотки
- p53mt** – p53 мутантный тип
- p53null** – Делеция p53
- p53wt** – p53 дикий тип
- PDGF** – Тромбоцитарный фактор роста
- PI** – Пропидий йодид

PI3K – Фосфатидилинозитол 3-киназа

RR – Радиорезистентные клетки

SBRT – Стереотаксическая лучевая терапия тела

γ H2AX – Фосфорилированный гистон H2AX

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence / H. Barker, J. Paget, A. Khan [et al.] / *Nat Rev Cancer*. – 2015. – V. 15, № 7. – P. 409-425.
2. Baumann, M. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance / M. Baumann, M. Krause, R. Hill // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – V. 8, № 7. – P. 545-554.
3. Timmerman, R. D. An overview of hypofractionation and introduction to this issue of seminars in radiation oncology / R. D. Timmerman // *Semin Radiat Oncol*. – 2008. – V. 18, № 4. – P. 215-222.
4. McGranahan, N. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future / N. McGranahan, C. Swanton // *Cell*. – 2017. – V. 168, № 4. – P. 613-628.
5. Jeggo, P. A. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective / P. A. Jeggo, L. H. Pearl, A. M. Carr // *Nat Rev Cancer*. – 2016. – V. 16, № 1. – P. 35-42.
6. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – V. 144, № 5. – P. 646-674.
7. DNA repair pathways as targets for cancer therapy / T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin [et al.] // *Nat Rev Cancer*. – 2008. – V. 8, № 3. – P. 193-204.
8. DNA Damage Response Assessments in Human Tumor Samples Provide Functional Biomarkers of Radiosensitivity / H. Willers, L. Gheorghiu, Q. Liu [et al.] // *Semin Radiat Oncol*. – 2015. – V. 25, № 4. – P. 237-250.
9. Ko, E. C. The Integration of Radiotherapy with Immunotherapy for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer / E. C. Ko, D. Raben, S.C. Formenti // *Clin Cancer Res*. – 2018. – V. 24, № 23. – P. 5792-5806.
10. Fidler, I. J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis / I. J. Fidler // *Cancer Res*. – 1978. – V. 38, № 9. – P. 2651-2660.

11. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing / M. Gerlinger, A. J. Rowan, S. Horswell [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – V. 366, № 10. – P. 883-892.
12. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia / K. Anderson, C. Lutz, F. W. van Delft // *Nature*. – 2011. – V. 469, № 7330. – P. 356-361.
13. Campbell, L. L. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution / L. L. Campbell, K. Polyak // *Cell Cycle*. – 2007. – V. 6, № 19. – P. 2332-2338 (2007)
14. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution / M. Shackleton, E. Quintana, E. R. Fearon, J. Morrison // *Cell*. – 2009. – V. 138, № 5. – P. 822-829.
15. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells / F. Notta, C. G. Mullighan, J. C.Y. Wang [et al.] // *Nature*. – 2011. – V. 469, № 7330. – P. 362-367.
16. Molecular definition of breast tumor heterogeneity / M. Shipitsin, L. L. Campbell, P. Argani [et al.] // *Cancer Cell*. – 2007. – V. 11, № 3. – P. 259-273.
17. Advancing a clinically relevant perspective of the clonal nature of cancer / C. Ruiz, E. Lenkiewicz, L. Evers [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2011. – V. 108, № 29. – P. 12054-12059.
18. Ashworth, A. Genetic interactions in cancer progression and treatment / A. Ashworth, C. J. Lord, J. S. Reis-Filho // *Cell*. – 2011. – V. 145, № 1. – P. 30-38.
19. Raj, A. Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences / A. Raj, A. van Oudenaarden // *Cell*. – 2008. – V. 135, № 2. – P. 216-226.
20. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors / P. Dalerba, T. Kalisky, D. Sahoo [et al.] // *Nature Biotechnol.* – 2011. – V. 29, № 12. – P. 1120-1127.

21. Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges / H. Clevers // *Nature Med.* – 2011. – V. 17, № 3. – P. 313-319.
22. Molecular mechanisms of tumor resistance to radiotherapy / Y. Wu, Y. Song, R. Wang, T. Wang // *Molecular Cancer.* – 2023. – V. 22, № 1. – Article: 96.
23. Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination / J. Li, H. Sun, Y. Huang [et al.] // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* – 2019. – V. 51, № 9. – P. 879-889.
24. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? / N. S. Gavande, P. S. VanderVere-Carozza, H. D. Hinshaw [et al.] // *Pharmacology & Therapeutics.* – 2016. – V. 160. – P. 65-83.
25. Involvement of Cdc25c in Cell Cycle Alteration of a Radioresistant Lung Cancer Cell Line Established with Fractionated Ionizing Radiation / J. Li, C.X. Yang, Z.J. Mei [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* – 2013. – V. 14, № 10. – P. 5725-5730.
26. Sensitisation of human lung adenocarcinoma A549 cells to radiotherapy by Nimotuzumab is associated with enhanced apoptosis and cell cycle arrest in the G2/M phase / S. Lin, Y. Yan, Y. Liu [et al.] // *Cell Biol Int.* – 2015. – V. 39, №2. – P. 146-151.
27. Cancer cells use self-inflicted DNA breaks to evade growth limits imposed by genotoxic stress / B. D. Larsen, J. Benada, P. Y. K. Yung [et al.] // *Science.* – 2022. – V. 376, № 6592. – P. 476-483.
28. BCL-2 Family Proteins Modulate Radiosensitivity in Human Malignant Glioma Cells / J. R. Streffer, A. Rimner, J. Rieger [et al.] // *Journal of Neuro-Oncology.* – 2002. – V. 56, № 1. – P. 43-49.
29. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells / J. U. Lee, R. Hosotani, M. Wada [et al.] // *European Journal of Cancer.* – 1999. – V. 35, № 9. – P. 1374-1380.
30. Zhang, L. Targeting Bcl-2 for cancer therapy / L. Zhang, Z. Lu, X. Zhao // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer.* – 2021. – V. 1876, № 1. – Article: 188569.

31. Shi, R. Metabolism in tumor microenvironment: Implications for cancer immunotherapy / R. Shi, Y. Q. Tang, H. Miao // *MedComm.* – 2020. – V. 1, № 1. – P. 47-68.
32. Arneth, B. Tumor Microenvironment / B. Arneth // *Medicina.* – 2019. – V. 56, № 1. – Article: 15.
33. A preliminary investigation of circulating extracellular vesicles and biomarker discovery associated with treatment response in head and neck squamous cell carcinoma / D. M. Rodrigues-Junior, S. S. Tan, L. de Souza Viana [et al.] // *BMC Cancer.* – 2019. – V. 19, № 1. – P. 373.
34. Expression profiles and potential functions of circular RNAs in extracellular vesicles isolated from radioresistant glioma cells / M. Zhao, J. Xu, S. Zhong [et al.] // *Oncology Reports.* – 2019. – V. 41, № 3. – P. 1893-1900.
35. Exosomes Derived from Squamous Head and Neck Cancer Promote Cell Survival after Ionizing Radiation / P. Busson, L. Mutschelknaus, C. Peters [et al.] // *Plos One.* – 2016. – V. 11, № 3. – Article: e0152213.
36. Exosome Transfer from Stromal to Breast Cancer Cells Regulates Therapy Resistance Pathways / M. C. Boelens, T. J. Wu, B. Y. Nabet [et al.] // *Cell.* – 2014. – V. 159, № 3. – P. 499-513.
37. Radiation-induced miR-208a increases the proliferation and radioresistance by targeting p21 in human lung cancer cells / Y. Tang, Y. Cui, Z. Li [et al.] // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* – 2016. – V. 35. – Article: 7.
38. Exosomes impact survival to radiation exposure in cell line models of nervous system cancer / O. D. Mrowczynski, A. B. Madhankumar, J. M. Sundstrom [et al.] // *Oncotarget.* – 2018. – V. 9, № 90. – P. 36083-36101.
39. AHIF promotes glioblastoma progression and radioresistance via exosomes / X. Dai, K. Liao, Z. Zhuang [et al.] // *International Journal of Oncology.* – 2019. – V. 54, № 1. – P. 261-270.
40. Molodtsova, D. Composition of Conditioned Media from Radioresistant and Chemoresistant Cancer Cells Reveals miRNA and Other Secretory Factors Implicated in the Development of Resistance / D. Molodtsova, D. V. Guryev,

- A. N. Osipov // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24, № 22. – Article: 16498.
41. Potential roles and prognostic significance of exosomes in cancer drug resistance / M. Mostafazadeh, N. Samadi, H. Kahroba [et al.] // Cell & Bioscience. – 2021. – V. 11, № 1. – Article: 1
 42. Sento, S. Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells Induced by Tumor Cell-Derived Exosomes / S. Sento, E. Sasabe, T. Yamamoto // Plos One. – 2016. – V. 11, № 2. – Article: e0148454.
 43. Plasminogen activator inhibitor-1 enhances radioresistance and aggressiveness of non-small cell lung cancer cells / J. Kang, W. Kim, T. Kwon [et al.] // Oncotarget. – 2016. – V. 7, № 17. – P. 23961-23974.
 44. Stem cell programs in cancer initiation, progression, and therapy resistance / T. Huang, X. Song, D. Xu [et al.] // Theranostics. – 2020. – V. 10, № 19. – P. 8721-8743.
 45. Cancer Stem Cells and Radioresistance: DNA Repair and Beyond / A. Schulz, F. Meyer, A. Dubrovskaya, K. Borgmann // Cancers. – 2019. – V. 11, № 6. – Article: 862.
 46. Trend analysis of cancer incidence and mortality in China / F. Wei, F. Xiong, C. Guo [et al.] // Sci China Life Sci. – 2017. – V. 60, № 11. – P. 1271-1275.
 47. Long non-coding RNA PVT1 predicts poor prognosis and induces radioresistance by regulating DNA repair and cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma / Y. He, Y. Tang, L. Yang [et al.] // Cell Death Dis. – 2018. – V. 9, № 2. – Article: 235.
 48. Jagsi, R. Progress and controversies: radiation therapy for invasive breast cancer / R. Jagsi // CA Cancer J Clin. – 2014. – V. 64, № 2. – P. 135-152.
 49. LncRNAs regulate the cytoskeleton and related Rho/ROCK signaling in cancer metastasis / Y. Tang, P. Zhang, J. Wang [et al.] // Mol Cancer. – 2018. – V. 17, № 1. – Article: 77.

50. AKT1 and MYC induce distinctive metabolic fingerprints in human prostate cancer / C. Priolo, S. Pyne, J. Rose [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – V. 74, № 24. – P. 7198-7204.
51. Twist promotes reprogramming of glucose metabolism in breast cancer cells through PI3K/AKT and p53 signaling pathways / L. Yang, Y. Hou, J. Yuan [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6, № 28. – P. 25755-25769.
52. Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1alpha / B. Faubert, E. E. Vincent, T. Griss [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. – V. 111, № 7. – P. 2554-2559.
53. Obesity promotes liver carcinogenesis via Mcl-1 stabilization independent of IL-6/Ralpha signaling / S. Gruber, B. K. Straub, P. J. Ackermann [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – V. 4, № 4. – P. 669-680.
54. Shared risk factors in cardiovascular disease and Cancer / R. J. Koene, A. E. Prizment, A. Blaes, S. H. Konety // *Circulation.* – 2016. – V. 133, № 11. – P. 1104-1114.
55. Zagar, T. M. Breast cancer therapy-associated cardiovascular disease / T. M. Zagar, D. M. Cardinale, L. B. Marks // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2016. – V. 13, № 3. – P. 172-184.
56. Szablewski, L. Diabetes mellitus: influences on cancer risk / L. Szablewski // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2014. – V. 30, № 7. – P. 543-553.
57. CDK1-mediated SIRT3 activation enhances mitochondrial function and tumor Radioresistance / R. Liu, M. Fan, D. Candas [et al.] // *Mol Cancer Ther.* – 2015. – V. 14, № 9. – P. 2090-2102.
58. Dahm-Daphi, J. Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells / J. Dahm-Daphi, C. Sass, W. Alberti // *Int J Radiat Biol.* – 2000. – V. 76, № 1. – P. 67-75.
59. Proteomic overview and perspectives of the radiation-induced bystander effects / F. Chevalier, D. H. Hamdi, Y. Saintigny, J. L. Lefaix // *Mutat Res Rev Mutat Res.* – 2015. – V. 763. – P. 280-293.

60. Impact of oncogenic K-RAS on YB-1 phosphorylation induced by ionizing radiation / M. Toulany, T. A. Schickfluss, W. Eicheler [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2011. – V. 13, № 2. – Article: R28.
61. Low Rap1-interacting factor 1 and sirtuin 6 expression predict poor outcome in radiotherapy-treated Hodgkin lymphoma patients / H. Bur, K. M. Haapasaari, T. Turpeenniemi-Hujanen [et al.] // *Leuk Lymphoma.* – 2018. – V. 59, № 3. – P. 679-689.
62. p38 MAPK signaling and phosphorylations in the BRCT1 domain regulate XRCC1 recruitment to sites of DNA damage / M. M. L. de Sousa, K. O. Bjoras, A. Hanssen-Bauer [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7, № 1. – Article: 6322.
63. SIRT1 enhances the survival of human embryonic stem cells by promoting DNA repair / J. Jang, Y. J. Huh, H. J. Cho [et al.] // *Stem Cell Reports.* – 2017. – V. 9, № 2. – P. 629-641.
64. BPIFB1 (LPLUNC1) inhibits radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by inhibiting VTN expression / F. Wei, L. Tang, Y. He [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2018. – V 9, № 4. – Article: 432.
65. Fractionated irradiation-induced EMT-like phenotype conferred radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma / H. Zhang, H. Luo, Z. Jiang [et al.] // *J Radiat Res.* – 2016. – V. 57, № 4. – P. 370-380.
66. Hypoxia-induced angiotensin II by the lactate-chymase-dependent mechanism mediates radioresistance of hypoxic tumor cells / G. Xie, Y. Liu, Q. Yao [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – Article: 42396.
67. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy / Y. Lei, D. Zhang, J. Yu [et al.] // *Cancer Lett.* – 2017. – V. 393. – P. 33-39.
68. Yoshida, G. J. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells / G. J. Yoshida, H. Saya // *Cancer Sci.* – 2016. – V. 107, № 1. – P. 5-11.
69. A perivascular niche for brain tumor stem cells / C. Calabrese, H. Poppleton, M. Kocak [et al.] // *Cancer Cell.* – 2007. – V. 11, № 1. – P. 69-82.

70. Comparative metabolic analysis in head and neck cancer and the normal gingiva / N. F. Voelxen, S. Blatt, P. Knopf [et al.] // Clin Oral Investig. – 2018. – V. 22, № 2. – P. 1033-1043.
71. Acute tumor lactate perturbations as a biomarker of genotoxic stress: development of a biochemical model / V. C. Sandulache, Y. Chen, H. D. Skinner [et al.] // Mol Cancer Ther. – 2015. – V. 14, № 12. – P. 2901-2908.
72. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice / V. Quennet, A. Yaromina, D. Zips [et al.] // Radiother Oncol. – 2006. – V. 81, № 2. – P. 130-135.
73. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma / M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, A. L. Harris, E. Sivridis // Cancer Res. – 2006. – V. 66, № 6. – P. 632-637.
74. Hypoxia-induced autophagy as an additional mechanism in human osteosarcoma radioresistance / H. Feng, J. Wang, W. Chen [et al.] // J bone Oncol. – 2016. – V. 5, № 2. – P. 67-73.
75. The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: melanogenesis leads to stimulation of HIF-1alpha expression and HIF-dependent attendant pathways / A. Slominski, T. K. Kim, A. A. Brozyna, [et al.] // Arch Biochem biophys. – 2014. – V. 563. – P. 79-93.
76. Hypoxia-induced autophagy reduces radiosensitivity by the HIF-1alpha/miR-210/Bcl-2 pathway in colon cancer cells / Y. Sun, X. Xing, Q. Liu [et al.] // Int J Oncol. – 2015. – V. 46, № 2. – P. 750-756.
77. The hypoxic microenvironment upgrades stem-like properties of ovarian cancer cells / D. Liang, Y. Ma, J. Liu [et al.] // BMC Cancer. – 2012. – V. 12. – Article: 201.
78. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth / A. Pietras, A. M. Katz, E. J. Ekstrom [et al.] // Cell Stem Cell. – 2014. – V. 14, № 3. – P. 357-369.

79. Sensitization of glioblastoma cells to irradiation by modulating the glucose metabolism / H. Shen, E. Hau, S. Joshi [et al.] // *Mol Cancer Ther.* – 2015. – V. 14, № 8. – P. 1794-1804.
80. Histone deacetylase inhibition and blockade of the glycolytic pathway synergistically induce glioblastoma cell death / V. Egler, S. Korur, M. Failly [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2008. – V. 14, № 10. – P. 3132-3140.
81. The NG2 proteoglycan protects oligodendrocyte precursor cells against oxidative stress via interaction with OMI/HtrA2 / F. Maus, D. Sakry, F. Binaime [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, № 9. – Article: e0137311.
82. Genome-Wide Analysis of 18 Epstein-Barr Viruses Isolated from Primary Nasopharyngeal Carcinoma Biopsy Specimens / C. Tu, Z. Zeng, P. Qi [et al.] // *J Virol.* – 2017. – V. 91, № 17. – Article: e00301-17.
83. Chen J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression / J. Chen // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* – 2016. – V. 6, № 3. – Article: a026104.
84. Chen J. The roles of MDM2 and MDMX phosphorylation in stress signaling to p53 / J. Chen // *Genes & cancer.* – 2012. – V. 3, № 3-4. – P. 274-282.
85. Gatz, S. A. p53 in recombination and repair / S. A. Gatz, L. Wiesmüller // *Cell Death & Differentiation.* – 2006. – V. 13, № 6. – P. 1003-1016.
86. p53 promotes repair of heterochromatin DNA by regulating JMJD2b and SUV39H1 expression / H. Zheng, L. Chen, W. J. Pledger [et al.] // *Oncogene.* – 2014. – V. 33, № 6. – P. 734-744.
87. Tan, T. p53 binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice / T. Tan, G. Chu // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22, № 10. – P. 3247-3254.
88. Adimoolam, S. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene / S. Adimoolam, J. M. Ford // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2002. – V. 99, № 20. – P. 12985-12990.

89. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage / H. Tanaka, H. Arakawa, T. Yamaguchi [et al.] // *Nature*. – 2000. – V. 404, № 6773. – P. 42-49.
90. Predominant role of DNA polymerase eta and p53-dependent translesion synthesis in the survival of ultraviolet-irradiated human cells / L. K. Lerner, G. Francisco, D. T. Soltys [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2017. – V. 45, № 3. – P. 1270-1280.
91. Sznarkowska, A. Pharmacological activation of tumor suppressor, wild-type p53 as a promising strategy to fight cancer / A. Sznarkowska, R. Olszewski, J. Zawacka-Pankau // *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. – 2010. – V. 64. – P. 396-407.
92. Electrochemotherapy as first line cancer treatment: experiences from veterinary medicine in developing novel protocols / E.P. Spugnini, T. Azzarito, S. Fais [et al.] // *Current cancer drug targets*. – 2016. – V. 16, № 1. – P. 43-52.
93. Yu, J. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control / J. Yu, L. Zhang // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2005. – V. 331, № 3. – P. 851-858.
94. Extracellular adenosine sensing—a metabolic cell death priming mechanism downstream of p53 / J. S. Long, D. Crighton, J. O'Prey [et al.] // *Molecular Cell*. – 2013. – V. 50, № 3. – P. 394-406.
95. Halazonetis, T. D. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development / T. D. Halazonetis, V. G. Gorgoulis, J. Bartek // *Science*. – 2008. – V. 319, № 5868. – P. 1352-1355.
96. Brown, J. P. Bypass of senescence after disruption of p21 CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts / J. P. Brown, W. Wei, J. M. Sedivy // *Science*. – 1997. – V. 277, № 5327. – P. 831-834.
97. Chen, Q. M. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts / Q. M. Chen, J. Liu, J. B. Merrett // *Biochemical Journal*. – 2000. – V. 347, Pt 2. – P. 543-551.

98. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path-- a mini-review / J. M. Vicencio, L. Galluzzi, N. Tajeddine [et al.] // *Gerontology*. – 2008. – V. 54, № 2. – P. 92-99.
99. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis / K. Bensaad, A. Tsuruta, M. A. Selak [et al.] // *Cell*. – 2006. – V. 126, № 1. – P. 107-120.
100. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications / Z. Chen, W. Lu, C. Garcia-Prieto, P. Huang // *Journal of bioenergetics and biomembranes*. – 2007. – V. 39, № 3. – P. 267-274.
101. p53 directly regulates the glycosidase FUCA1 to promote chemotherapy-induced cell death / A. D. Baudot, D. Crighton, J. O'Prey [et al.] // *Cell Cycle*. – 2016. – V. 15, № 17. – P. 2299-2308.
102. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species / S. Suzuki, T. Tanaka, M. V. Poyurovsky [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107, № 16. – P. 7461-7466.
103. Böhlig, L. p53 activates the PANK1/miRNA-107 gene leading to downregulation of CDK6 and p130 cell cycle proteins / L. Böhlig, M. Friedrich, K. Engeland // *Nucleic acids research*. – 2011. – V. 39, № 2. – P. 440-453.
104. The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways / Z. Feng, W. Hu, E. de Stanchina [et al.] // *Cancer research*. – 2007. – V. 67, № 7. – P. 3043-3053.
105. Liu, G. The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis / G. Liu, X. Chen // *Oncogene*. – 2002. – V. 21, № 47. – P. 7195-7204.
106. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis / D. Crighton, S. Wilkinson, J. O'Prey [et al.] // *Cell*. – 2006. – V. 126, № 1. – P. 121-134.

107. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells / Z. Feng, H. Zhang, A. J. Levine, S. Jin [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102, № 23. – P. 8204-8209.
108. Budanov, A. V. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling / A. V. Budanov, M. Karin // *Cell*. – 2008. – V. 134, № 3. – P. 451-460.
109. Budde, A. p53 represses ribosomal gene transcription / A. Budde, I. Grummt // *Oncogene*. – 1999. – V. 18, № 4. – P. 1119-1124.
110. Importin 7 and exportin 1 link c-Myc and p53 to regulation of ribosomal biogenesis / L. Golomb, D. R. Bublik, S. Wilder [et al.] // *Molecular cell*. – 2012. – V. 45, № 2. – P. 222-232.
111. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop / X. Wu, J. H. Bayle, D. Olson, A. J. Levine // *Genes & development*. – 1993. – V. 7, № 7A. – P. 1126-1132.
112. Okamoto, K. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein / K. Okamoto, D. Beach // *The EMBO journal*. – 1994. – V. 13, № 20. – P. 4816-4822.
113. Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites / M. Rossi, O. N. Demidov, C. W. Anderson // *Nucleic acids research*. – 2008. – V. 36, № 22. – P. 7168-7180.
114. Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes / M. Fischer // *Oncogene*. – 2017. – V. 36, № 28. – P. 3943-3956.
115. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes / R. Gomez-Casal, C. Bhattacharya, N. Ganesh [et al.] // *Molecular cancer*. – 2013. – V. 12, № 1. – P. 1-13.
116. Эпителиально-мезенхимальный переход: злокачественная прогрессия и перспективы противоопухолевой терапии / А. В. Гапонова, С. Родин, А. А. Мазина, П. В. Волчков // *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*. – 2020. – Т. 12. – № 3 (46). – С. 4-23.

117. Logan, S. M. Medial epithelial seam cell migration during palatal fusion / S. M. Logan, M. D. Benson // *Journal of Cellular Physiology*. – 2020. – V. 235, № 2. – P. 1417-1424.
118. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis / S. Lovisa, V. S. LeBleu, B. Tampe [et al.] // *Nature medicine*. – 2015. – V. 21, № 9. – P. 998-1009.
119. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis / M. Iwano, D. Plieth, Th. M. Danoff [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2002. – V. 110, № 3. – P. 341-350.
120. Development and characterisation of acquired radioresistant breast cancer cell lines / M. Gray, A. K. Turnbull, C. Ward [et al.] // *Radiation oncology*. – 2019. – V. 14, № 1. – P. 1-19.
121. Vyas, S. Mitochondria and cancer / S. Vyas, E. Zaganjor, M. C. Haigis // *Cell*. – 2016. – V. 166, № 3. – P. 555-566.
122. Relationship between p53 status and the bioeffect of ionizing radiation / X. Kong, D. Yu, Z. Wang, S. Li // *Oncology Letters*. – 2021. – V. 22, № 3. – P. 1-8.
123. Mutant p53 in cancer progression and targeted therapies / G. Zhu, Ch. Pan, J. – X. Bei [et al.] // *Frontiers in oncology*. – 2020. – V. 10. – Article: 595187.
124. Mantovani, F. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell / F. Mantovani, L. Collavin, G. Del Sal // *Cell Death & Differentiation*. – 2019. – V. 26, № 2. – P. 199-212.
125. Mutant p53 gain-of-function: role in cancer development, progression, and therapeutic approaches / E. Alvarado-Ortiz, K. G. de la Cruz-López, J. Becerril-Rico [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 8. – Article: 607670.
126. Olivier, M. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use / M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – V. 2, № 1. – Article: a001008.

127. Irradiation selects for p53-deficient hematopoietic progenitors / A. Marusyk, Ch. C. Porter, V. Zaberezhnyy, J. DeGregori // *PLoS biology*. – 2010. – V. 8, № 3. – Article: e1000324.
128. Tchelebi, L. Mutant p53 and the response to chemotherapy and radiation / L. Tchelebi, H. Ashamalla, P. R. Graves // *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*. – 2014. – V. 85. – P. 133-159.
129. p53 mutations associated with increased sensitivity to ionizing radiation in human head and neck cancer cell lines / K. Servomaa, A. Kiuru, R. Grénman [et al.] // *Cell proliferation*. – 1996. – V. 29, № 5. – P. 219-230.
130. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo / S. W. Lowe, S. Bodis, A. McClatchey [et al.] // *Science*. – 1994. – V. 266, № 5186. – P. 807-810.
131. Matsui, Y. Effects of p53 mutations on cellular sensitivity to ionizing radiation / Y. Matsui, Y. Tsuchida, P. C. Keng // *American journal of clinical oncology*. – 2001. – V. 24, № 5. – P. 486-490.
132. The tumor suppressor, p53, contributes to radiosensitivity of lung cancer cells by regulating autophagy and apoptosis / G. Cheng, D. Kong, X. Hou [et al.] // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. – 2013. – V. 28, № 2. – P. 153-159.
133. Prescribing, Recording, and Reporting of Stereotactic Treatments with Small Photon Beams : ICRU Report 91 / The international commission on radiation units and measurements // *Journal of the ICRU*. – 2014. – V. 14, № 2. – [12], 144 p.
134. Ahmed, K. A. Stereotactic Body Radiotherapy in the Management of Oligometastatic Disease / K. A. Ahmed, J. F. Torres-Roca // *Cancer Control*. – 2016. – V. 23, № 1. – P. 21-29.
135. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis / M. Garcia-Barros, F. Paris, C. Cordon-Cardo [et al.] // *Science*. – 2003. – V. 300, № 5622. – P. 1155-1159.

136. Universal survival curve and single fraction equivalent dose: useful tools in understanding potency of ablative radiotherapy / C. Park, L. Papiez, S. Zhang [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2008. – V. 70, № 3. – P. 847-852.
137. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity / C. Vanpouille-Box, A. Alard, M. J. Aryankalayil [et al.] // *Nat Commun.* – 2017. – V. 9, № 8. – Article: 15618.
138. High-dose and fractionation effects in stereotactic radiation therapy: Analysis of tumor control data from 2965 patients / I. Shuryak, D. J. Carlson, J. M. Brown, D. J. Brenner // *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* – 2015. – V. 115, № 3. – P. 327-334.
139. IR-Surviving NSCLC Cells Exhibit Different Patterns of Molecular and Cellular Reactions Relating to the Multifraction Irradiation Regimen and p53-Family Proteins Expression / L. Alhaddad, M. Pustovalova, T. Blokhina [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2021. – V. 13, № 11. – Article: 2669.
140. Особенности опухолевых клеток человека линии HeLa, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения / Д. В. Гурьев, А. А. Цишнатти, С. М. Роднева [и др.] // *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* – 2022. – Т. 67, № 4. – С. 5–9.
141. Стереотаксическая лучевая терапия ранних форм рака почки / А. В. Черниченко, И. В. Корнилов, Н. В. Воробьёв [и др.] // *Онкология. Журнал им. П. А. Герцена.* – 2024. – Т. 13, № 5. – С. 5-11.
142. Стереотаксическая радиотерапия метастазов рака молочной железы в печени / С. И. Ткачёв, С. Б. Алиева, С. В. Медведев [и др.] // *Вопросы онкологии.* – 2021. – Т. 67, № 3. – С. 382-390.
143. Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Oligo-metastases: Systematic Review and International Stereotactic Radiosurgery Society Practice Guidelines / M. Mayinger, R. Kotecha, A. Sahgal [et al.] // *Lung Cancer.* – 2023. – V. 182. – Article: 107284.

144. Деньгина, Н. В. Стереотаксическая лучевая терапия и локальная гипертермия в лечении опухолей различных локализаций / Н. В. Деньгина, Е. Я. Мозерова // Практическая онкология. – 2015. – Т. 16, № 4. – С. 162-173.
145. Выбор режимов фракционирования при стереотаксической лучевой терапии больных ранними стадиями рака легкого / Ю. И. Барт, Д. А. Глибичук, Р. Ш. Абдулаева, [и др.] // Злокачественные опухоли. – 2023. – Т. 13, № 1. – С. 30-35.
146. Влияние облучения в сверхвысоких дозах на криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки: двунитевые разрывы ДНК и пролиферативная активность / А. А. Цишнатти, М. В. Пустовалова, А. К. Грехова [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2019. – Т. 64, № 4. – С. 18–24.
147. Lack of hyper-radiosensitivity and induced radioresistance and of bystander effect in V79 cells after proton irradiation of different energies / R. Cherubini, V. De Nadal, S. Gerardi, D. Guryev // Radiation Protection Dosimetry. – 2011. – V. 143, № 2-4. – P. 315-319.
148. Clonogenic assay of cells in vitro / N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap [et al.] // Nat Protoc. – 2006. – V. 1, № 5. – P. 2315-2319.
149. Hill, D. S. Induction of endoplasmic reticulum stress as a strategy for melanoma therapy: is there a future? / D. S. Hill, P. E. Lovat, N. K. Haass // Melanoma Manag. – 2014. – V. 1, № 2. – P. 127-137.
150. Cell cycle phase-specific drug resistance as an escape mechanism of melanoma cells / K. A. Beaumont, D. S. Hill, S. M. Daignault [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2016. – V. 136, № 7. – P. 1479-1489.
151. The p53–53BP1-related survival of A549 and H1299 human lung cancer cells after multifractionated radiotherapy demonstrated different response to additional acute X-ray exposure / M. Pustovalova, L. Alhaddad, N. Smetanina [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – V. 21, № 9. – Article: 3342.
152. Sun, X. Ki-67: more than a proliferation marker / X. Sun, P. D. Kaufman // Chromosoma. – 2018. – V. 127, № 2. – P. 175-186.

153. Pawlik, T. M. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy / T. M. Pawlik, K. Keyomarsi // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2004. – V. 59, № 4. – P. 928-942.
154. Dillon, M. T. Selective targeting of the G2/M cell cycle checkpoint to improve the therapeutic index of radiotherapy / M. T. Dillon, J. S. Good, K. J. Harrington // *Clinical Oncology.* – 2014. – V. 26, № 5. – P. 257-265.
155. The increment of micronucleus frequency in cervical carcinoma during irradiation in vivo and its prognostic value for tumour radiocurability / M. Widel, S. Jedruś, S. Owczarek [et al.] // *Br J Cancer.* – 1999. – V. 80, № 10. – P. 1599-1607.
156. Cell survival and radiosensitisation: modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review) / N. A. Franken, A. L. Oei, H. P. Kok [et al.] // *Int J Oncol.* – 2013. – V. 42, № 5. – P. 1501-1515.

ПРИЛОЖЕНИЕ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

генерального директора

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ

им. А.И. Бурназяна ФМБА России

доктор мед. наук, профессор

А.Ю. Бушманов



2021 г.

АКТ

О внедрении научных результатов диссертации Цишнатти Андрея Андреевича в научно-исследовательскую деятельность отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что научные положения, результаты и выводы кандидатской диссертации Цишнатти Андрея Андреевича на тему «Особенности опухолевых клеток человека, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения» внедрены в научно-исследовательский процесс отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Для эффективного внедрения были проведены следующие мероприятия:

1. Изучение текущих потребностей научно-исследовательской деятельности центра.
2. Анализ соответствия результатов диссертации актуальным направлениям исследований центра.
3. Регулярное обсуждение промежуточных итогов внедрения среди сотрудников лаборатории и руководство центра.

Внедрение научных результатов позволило:

- повысить точность проводимых исследований,
- расширить спектр изучаемых проблем и областей,
- оптимизировать процессы обработки и интерпретации данных,
- увеличить количество публикаций сотрудников центра в ведущих российских и международных изданиях

Рабочей группе отдела экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России рекомендовано продолжать изучение и применение результатов диссертации, провести оценку возможности распространения полученного опыта среди других научных подразделений.

Заведующий отделом
экспериментальной радиобиологии
и радиационной медицины
ФГБУ ГНЦ ФМБЦ
им. А.И. Бурназяна ФМБА России
д.б.н., профессор РАН

 Осипов А.Н.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»
(НИЯУ МИФИ)»**

Инженерно-физический институт биомедицины

08.07.2025 № 546/25-128
На № _____ от _____

АКТ

О внедрении результатов кандидатской диссертации Цишнатти Андрея Андреевича на тему «Особенности опухолевых клеток человека, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения»

Настоящий акт подтверждает, что результаты кандидатской диссертации Цишнатти Андрея Андреевича на тему «Особенности опухолевых клеток человека, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения» успешно внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской физики Инженерно-физического института биомедицины Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ».

С 2022/2023 уч. года результаты, представленные в диссертации, были включены в программу курса «Медико-биологические основы безопасности», а также в программу дополнительного профессионального образования «Перспективные технологии лучевой диагностики и терапии на основе отечественного парка ускорительной техники». Внедрение результатов исследования позволило укрепить связи между учебным процессом и научными достижениями современной науки, а также улучшить формирование устойчивого интереса к дальнейшему развитию карьеры в сфере радиационной биологии и смежных областях знания.

Директор

А.А. Гармаш

