

ОБНИНСКИЙ ИНСТИТУТ АТОМНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ – ФИЛИАЛ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЯДЕРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ «МИФИ»

На правах рукописи

Мельникова Анжелика Александровна

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ И АНТИБИОТИКА
АНТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА ДОКСОРУБИЦИНА В ОТНОШЕНИИ
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕВОГО И НОРМАЛЬНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ *IN VITRO*

1.5.1. Радиобиология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Комарова Людмила Николаевна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Лучевая терапия опухолевых заболеваний	15
1.1.1 Современное состояние и перспективы развития адронной терапии.....	21
1.1.2 Молекулярные механизмы радиационного ответа: роль ключевых генов	22
1.2 Субкультура и клеточные линии	24
1.2.1 Культура клеток	24
1.3 Противоопухолевая активность химиопрепаратов	28
1.3.1 Молекулярные механизмы противоопухолевого действия доксорубицина.....	28
1.3.2 Скрининг противоопухолевых соединений <i>in vitro</i>	30
1.4 Комбинированная радио-химиотерапия: исследование синергизма.....	32
1.5 Современное понимание механизмов клеточной гибели.....	32
1.5.1 Основные типы клеточной гибели	33
1.5.2 Внутренний путь апоптоза.....	35
1.5.2.1 Роль белка Noxa в регуляции апоптоза.....	39
1.5.3 Внешний путь апоптоза.....	41
1.5.4 Ингибиторы апоптоза. Белок Survivin	42
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1 Объекты исследования	47
2.2 Культивирование клеток	48
2.3 Обработка клеток противоопухолевым препаратом	48
2.4 Условия облучения	49
2.5 Методика проведения эксперимента.....	51
2.5.1 Оценка ОБЭ	52
2.5.2 Расчет коэффициента взаимодействия исследуемых агентов.....	53
2.5.3 Определение клоногенности.....	54
2.5.4 Определение времени удвоения	55
2.5.5 Анализ метаболической активности клеток (МТТ-тест)	56
2.5.6 Анализ жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии.....	57
2.6 Анализ генетических механизмов ответа на ионизирующее излучение	58
2.6.1 Выбор генов-кандидатов для проведения исследования	58
2.6.2 Разработка праймеров для ПЦР в реальном времени	58

2.6.3 Выделение РНК.....	60
2.6.4 Количественная оценка РНК с помощью спектрофотометрии.....	61
2.6.5 Проведение ПЦР-РВ.....	63
2.6.6 Биоинформатический анализ. Анализ белок-белковых взаимодействий	66
2.7 Статистическая обработка данных	68
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	69
3.1 Сравнение чувствительности клеток изучаемых линий к действию ионизирующего излучения и химиопрепарата доксорубицина	69
3.1.1 Анализ клоногенной активности клеток при действии излучений с различной ЛПЭ..	69
3.1.2 Анализ ОБЭ излучений с различной ЛПЭ	80
3.2 Оценка пролиферативной активности клеточных популяций.....	84
3.3 Анализ метаболической активности клеток	91
3.4 Сравнение клеточных линий по выраженности радиобиологических эффектов	98
3.5 Анализ выживаемости методом проточной цитометрии	101
3.6 Анализ генов-кандидатов, вовлеченных в регуляцию апоптоза.....	107
3.6.1 Биоинформатический анализ. Анализ белок-белковых взаимодействий	110
3.7 Результаты разработки праймеров для ПЦР-РВ.....	122
3.8 Анализ экспрессии генов	124
3.8.1 Анализ экспрессии генов <i>BIRC5</i> и <i>PMAIP1</i> в клетках MCF-7.....	125
3.8.2 Анализ экспрессии генов <i>BIRC5</i> и <i>PMAIP1</i> в клетках SK-N-BE(2).....	131
3.9 Корреляция между радиобиологическими признаками и экспрессией генов.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ВЫВОДЫ.....	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	150

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Значительный рост онкологических заболеваний в Российской Федерации (более 600 000 случаев ежегодно) и потенциальная клиническая значимость адронной терапии для значительной части пациентов обуславливают острую необходимость в проведении фундаментальных и трансляционных исследований, направленных на оптимизацию режимов фракционирования дозы, повышение радиочувствительности опухолевых клеток и снижение токсического воздействия на нормальные ткани, что позволит расширить спектр клинических показаний и повысить эффективность адронной терапии [10]. Данный вектор подразумевает детальное изучение параметров адронного излучения для сравнения относительной биологической эффективности (ОБЭ) тяжелых заряженных частиц с фотонным излучением, с учётом микродозиметрических параметров и распределения поглощённой дозы, выявление механизмов, определяющих ОБЭ, разработку и оценку эффективности новых, а также переоценку известных радиосенсибилизаторов (например, доксорубицина) для повышения эффективности адронной терапии. Использование синхротронного излучения в исследованиях взаимодействия тяжелых заряженных частиц с биологическими тканями на молекулярном и клеточном уровнях является необходимым условием для разработки и усовершенствования адронной терапии злокачественных новообразований.

Применение химиотерапевтических препаратов в комбинации с лучевой терапией может привести к синергическому эффекту, который проявляется в усилении цитотоксического действия, подавлении процессов репарации ДНК в опухолевых клетках и, как следствие, повышении эффективности противоопухолевой терапии. Одним из широко применяемых противоопухолевых средств является представитель антрациклинового класса цитотоксических антибиотиков доксорубицин, эффективность которого подкреплена надежными доказательствами, полученными в результате серии клинических испытаний, и находит отражение в современных клинических руководствах и терапевтических

протоколах [1]. Показанием к применению являются различные типы солидных опухолей, включая, но не ограничиваясь, рак молочной железы, гепатоцеллюлярный рак, рак шейки матки, нейробластома [17, 24, 25, 35]. Первые сообщения о препарате в научной литературе относятся к 1972 году, после чего были запущены многочисленные клинические исследования для определения его эффективности и безопасности при лечении злокачественных опухолей. В числе ранних исследований была оценка эффективности доксорубина в монотерапии метастатического рака молочной железы, результаты которой в значительной мере способствовали широкому внедрению этого препарата в клиническую практику.

В контексте современных возможностей лучевая терапия представляет собой один из основополагающих методов, широко применяемых для лечения злокачественных новообразований различной локализации. Несмотря на значительный прогресс в развитии технологий лучевой терапии, проблема радиорезистентности опухолевых клеток остается крайне актуальной, что, в свою очередь, приводит к существенному ограничению эффективности проводимого лечения. В этой связи, первостепенное научное значение приобретает детальное изучение молекулярно-биологических механизмов, лежащих в основе устойчивости опухолевых клеток к ионизирующему излучению. В частности, для создания инновационных терапевтических стратегий, направленных на селективное уничтожение раковых клеток, требуется тщательное изучение молекулярных механизмов репарации ДНК, а также детальное исследование путей регуляции различных форм клеточной гибели, которые активируются в ответ на терапевтические воздействия.

Важно отметить, что цитотоксический эффект, индуцируемый ионизирующим излучением и ДНК-повреждающими агентами в значительной степени обусловлен их способностью инициировать процесс апоптоза. Этот процесс регулируется сложным взаимодействием белков семейства Bcl-2, включающим как про-, так и антиапоптотические факторы. Проапоптотический ген *PMAIP1*, кодирующий белок Noxa, является мощным индуктором, играющим

ключевую роль в запуске апоптоза. Noxa ингибирует антиапоптотические белки (например, Mcl-1), активируя эффекторные белки Bax/Bak, что вызывает пермеабиллизацию митохондриальной мембраны и инициацию апоптотического каскада.

В контрасте с проапоптотическими механизмами, Survivin, член семейства ингибиторов апоптоза (IAP), представляет собой перспективную молекулярную мишень благодаря своей роли в клеточной пролиферации и подавлении апоптоза, участию в процессах онкогенеза и метастазирования, развития лекарственной резистентности, а также значительно большей экспрессии в опухолевых клетках по сравнению с нормальными тканями.

Для выяснения молекулярных механизмов, определяющих радиочувствительность опухолевых клеток, представляется необходимым изучить влияние ионизирующего излучения с различной линейной передачей энергии (ЛПЭ) на экспрессию генов *PMAIP1* (Noxa) и *BIRC5* (Survivin). В частности, количественный анализ изменений уровня экспрессии этих генов, продукты которых являются ключевыми регуляторами апоптоза, позволит установить зависимость между параметрами облучения и клеточным ответом.

Таким образом, результаты радиобиологического исследования экспрессии *PMAIP1* и *BIRC5* являются значимыми для оптимизации адронной терапии, поскольку позволяют установить корреляцию между физическими параметрами излучения и биологическим эффектом на клеточном уровне, что, в конечном счете, способствует разработке более эффективных и безопасных методов лучевой онкотерапии.

Степень разработанности проблемы. В контексте современной радиобиологии, процессы взаимодействия ионизирующего излучения с опухолевыми клетками, анализируемые в условиях *in vitro*, охватывают широкий спектр научных направлений, проводимых как отечественными, так и зарубежными исследовательскими группами [4, 96, 97, 120, 130, 141].

Несмотря на обширный объем исследований, посвященных изучению влияния ионизирующего излучения на клетки различного генеза, а также работы,

рассматривающие комбинированное действие ионизирующего излучения и химиотерапевтических препаратов, ряд ключевых вопросов остается дискуссионным. В частности, требуют дальнейшего изучения сложные молекулярные процессы, происходящие в ответ на действие корпускулярного излучения и химиотерапевтических агентов, в том числе, при их раздельном и комбинированном применении. С целью внесения вклада в решение этой научной задачи, в настоящей работе предполагается охарактеризовать динамику транскрипционной активности генов *BIRC5* и *PMAIP1* в опухолевых клетках, подвергнутых воздействию γ -излучения, протонов, ионов ^{12}C как в условиях монотерапии, так и в случае комбинированного действия с широко используемым противоопухолевым препаратом (доксорубицином). Для комплексного анализа применены следующие методы: клоногенный анализ (эталонный метод в радиобиологии), оценка пролиферативной (время удвоения) и метаболической (МТТ-тест) активностей клеток, анализ жизнеспособности клеток с помощью проточной цитометрии, а также количественное определение экспрессии генов с использованием стандартных протоколов выделения РНК, её количественного анализа и обратной транскрипции ПЦР.

Цель диссертационной работы: оценка действия ионизирующего излучения разного качества и химиопрепарата доксорубицина на опухолевые и нормальные клетки *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Изучить чувствительность клеточных линий MCF-7, SK-N-BE(2), HeLa, HUH-7 и hTERT к действию ионизирующего излучения и химиопрепарата доксорубицина с применением различных методических подходов.
2. Провести оценку биологической эффективности протонного излучения и ионов ^{12}C на клетки линий MCF-7, SK-N-BE(2), HeLa, HUH-7 и hTERT.
3. Провести биоинформатический анализ для выявления генов-кандидатов, вовлеченных в регуляцию апоптоза, с последующим дизайном

праймеров для количественного анализа экспрессии отобранных генов методом ПЦР-РВ.

4. Выявить и комплексно проанализировать регуляторные сети генов *BIRC5* и *PMAIP1* с применением анализа онтологии генов (GO) для определения их молекулярных функций, вовлеченности в биологические процессы и локализации в клеточных компартментах.

5. Провести анализ уровней экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках линии MCF-7 и SK-N-BE(2) после действия γ -излучения, протонов, ионов ^{12}C в комбинации с доксорубицином.

6. Выявить наличие корреляционной зависимости между уровнями экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* и радиобиологическими эффектами, характеризующими клоногенный, пролиферативный и метаболический потенциал клеток.

Научная новизна. В диссертационной работе получены новые данные о влиянии ионизирующего излучения разного качества (γ -излучение, ионы ^{12}C , протоны) на пять различных клеточных линий (hTERT, MCF-7, SK-N-BE(2), HeLa, HUH-7) с применением комплексного методологического подхода, включающего: оценку выживаемости посредством анализа колониеобразования, определение пролиферативной активности, количественную оценку митохондриальной активности с применением МТТ-теста, анализ с использованием проточной цитометрии (7-AAD), анализ экспрессии генов, регулирующих апоптоз *PMAIP1* (Noxa) и *BIRC5* (Survivin), что обеспечивает более полную и достоверную оценку биологического ответа клеток на комбинированное применение химических и физических факторов по сравнению с использованием отдельных методов.

Впервые установлена корреляционная зависимость между физическими характеристиками излучения, молекулярными механизмами клеточного ответа (включая апоптоз, репарацию ДНК и регуляцию экспрессии генов, таких как *BIRC5* и *PMAIP1*), и фенотипическими проявлениями радиочувствительности/радиорезистентности, что способствует разработке более

точных моделей прогнозирования ответа на лучевую терапию, обоснованию персонализированных радиотерапевтических протоколов, а также идентификации новых молекулярных мишеней для повышения эффективности лучевого лечения с помощью радиосенсибилизирующих агентов.

Отличительной особенностью настоящего исследования является комплексный анализ механизмов ответа опухолевых клеток на воздействие ионизирующего излучения различного качества как в условиях монотерапии, так и в комбинации с доксорубицином. В частности, научная новизна представленной работы заключается в выявлении ранее не охарактеризованных особенностей взаимодействия различных видов ионизирующего излучения и доксорубицина на молекулярном и клеточном уровнях.

Теоретическая и практическая значимость. Представленное радиобиологическое исследование способствует углублению представлений о молекулярных механизмах, детерминирующих клеточный ответ на комбинированное действие химиотерапевтического агента доксорубицина и ионизирующего излучения. Многопараметрический подход, включающий анализ выживаемости (колониобразующий тест), пролиферации (время удвоения), метаболической активности (МТТ-тест), апоптоза/некроза (проточная цитометрия с 7-AAD) и экспрессии ключевых генов (*BIRC5* и *PMAIP1*), обеспечивает глубокое понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе клеточного ответа на облучение. Полученные данные расширяют фундаментальное понимание механизмов взаимодействия ионизирующего излучения с биологическими системами и могут быть использованы для создания более точных моделей радиобиологического действия.

Полученные результаты имеют значительный потенциал для развития радиогеномики, позволяя интегрировать геномные данные в прогнозирование ответа на лучевую терапию и разработку более эффективных стратегий борьбы с онкологическими заболеваниями. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, позволяют сформулировать перспективные направления дальнейших исследований, нацеленных на раскрытие молекулярных механизмов,

лежащих в основе вариабельности радиочувствительности клеток злокачественных опухолей. Особый интерес представляет изучение роли процессов апоптоза и репарации ДНК в контексте разработки новых терапевтических стратегий, направленных на повышение эффективности лучевой терапии. Стратегия селективного воздействия на молекулярные мишени (гены *BIRC5* и *PMAIP1*) может рассматриваться как один из перспективных путей повышения радиочувствительности опухолевых клеток. Результаты диссертационного исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность и образовательный процесс отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ, в частности, в рамках подготовки студентов по направлениям 03.03.02 – Физика, 06.03.01, 06.04.01 – Биология, 31.05.01 – Лечебное дело при изучении таких дисциплин, как «Радиобиология», «Онкология», «Лучевая терапия и диагностика».

Методология и методы исследования. В основу методологии и теоретических положений диссертационного исследования легли данные, представленные в отечественных и зарубежных работах в области радиобиологии.

Объектами исследования были выбраны клеточные линии, широко используемые в качестве *in vitro* моделей: четыре линии опухолевых клеток (MCF-7, HeLa, SK-N-BE(2), HUH-7), репрезентирующие различные типы злокачественных новообразований, а также фибробласты линии hTERT.

Клетки подвергали воздействию γ -излучения на установке «ГУР-120» (^{60}Co) (НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ). Эксперименты по облучению клеток ионами ^{12}C проводились на базе ускорителя У-70, расположенного в Институте физики высоких энергий (ИФВЭ), входящем в состав ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт». Для расширения области исследования эксперименты также проводились на комплексе протонной терапии «Прометеус». Данный комплекс расположен на базе Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

В исследовании проведена комплексная оценка влияния действия ионизирующего излучения различного спектрального состава и

противоопухолевого антибиотика доксорубицина на клеточные культуры. Были определены следующие параметры: относительная биологическая эффективность излучения, клоногенная способность клеток, скорость пролиферации и метаболическая активность. Для количественной оценки синергизма/антагонизма между ионизирующим излучением и доксорубицином был рассчитан коэффициент взаимодействия. Исследование основывалось на мультимодальном подходе, сочетающем высокопроизводительные методы клеточной биологии и молекулярной генетики. Использование проточной цитометрии в рамках настоящего исследования позволило получить процент жизнеспособных и апоптотических клеток, характеризующие состояние клеточных популяций, подвергнутых различным воздействиям.

Для молекулярно-генетического анализа были применены оптимизированные протоколы выделения РНК из клеточных культур с последующей обратной транскрипцией и полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР-РВ), что позволило с высокой точностью определить относительный уровень экспрессии целевых генов. Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием программных пакетов Microsoft Excel 2019, IBM SPSS Statistics 26 и OriginPro 8.

Положения, выносимые на защиту.

1. Клетки аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 проявляют максимальную чувствительность к комбинированному действию доксорубицина и корпускулярного излучения. Фибробласты линии hTERT проявляют наибольшую чувствительность к корпускулярному излучению, оцениваемую по клоногенной и пролиферативной активности, тогда как подавление метаболической активности наиболее значительно при действии ионов ^{12}C и γ -излучения. Клетки линий HeLa и HUH-7 характеризуются умеренной чувствительностью. Резистентность клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) значительно выше к действию как γ -излучения, так и к корпускулярному излучению.

2. Показатели ОБЭ ионов ^{12}C и протонного излучения для клеточных линий MCF-7, SK-N-BE(2), HeLa, HUH-7, hTERT демонстрируют зависимость

радиобиологического эффекта от типа ионизирующего излучения и клеточной линии. ОБЭ ионов ^{12}C для клеток линии MCF-7 составила $2,07 \pm 0,07$, для клеток линии SK-N-BE(2) – $2,75 \pm 0,01$, для клеток линии HeLa – $1,81 \pm 0,13$, для клеток линии HUH-7 – $1,50 \pm 0,05$, для иммортализованных фибробластов линии hTERT – $2,90 \pm 0,12$, ОБЭ протонного излучения – MCF-7 – $1,59 \pm 0,09$, SK-N-BE(2) – $1,27 \pm 0,06$, HeLa – $1,01 \pm 0,05$, HUH-7 – $1,23 \pm 0,03$, hTERT – $2,56 \pm 0,49$.

3. Выявлена статистически значимая положительная корреляционная зависимость между экспрессией гена *BIRC5* и клоногенной активностью при комбинированном действии доксорубина и γ -излучения в клетках линии MCF-7 и обратная корреляция между уровнем экспрессии гена *PMAIP1* и клоногенной активностью клеток после комбинированного действия доксорубина и протонного излучения. Наличие положительных корреляций между уровнем экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* и ключевыми радиобиологическими показателями клеток линии SK-N-BE(2) имеется только при комбинированном действии доксорубина и ионизирующего излучения.

Достоверность результатов. Достоверность результатов работы подтверждается репрезентативностью выборки (в исследование включено 5 клеточных линий), использованием современных методов исследований, обработкой полученных данных с использованием специализированного программного обеспечения, включающего Microsoft Excel 2019, IBM SPSS Statistics 26 и OriginPro 8.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. В соответствии с формулой специальности 1.5.1 «Радиобиология», охватывающей взаимодействие различных видов ионизирующего излучения с веществом (п.1), исследования закономерностей биологического ответа на воздействие ионизирующих излучений и разработку эффективных средств и способов управления радиобиологическими эффектами (п.2), механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками (п.4), механизмы действия ионизирующих излучений на ДНК,

РНК, белки и клеточные мембраны (п.5), в диссертационном исследовании представлены результаты изучения влияния ионизирующего излучения на клетки человека различного генеза *in vitro*.

Апробация работы. Основные положения диссертации (результаты исследования) представлены на: 9Th International Conference on radiation in various fields of research «RAD 2021 – 9th International Conference on Radiation in Various Fields of Research, Conference Proceeding» (Herceg Novi, 2021); the The 6-th International Symposium and Schools for Young Scientists on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine» (Moscow, 2021); XXVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2025); школе-конференции молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения 2022» (Москва, 2022); Международной научной конференции «Инновационные технологии ядерной медицины и лучевой диагностики и терапии» (Москва, 2023); VII Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию образования филиала № 2 Государственного научного центра – института биофизики (Томск, 2023); IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков (Новосибирск, 2021, 2023); 52-й научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, посвященной 90-летию КБГУ «Актуальные вопросы медицины» (Нальчик, 2022); 64-й Всероссийской научной конференции МФТИ (Москва-Долгопрудный-Жуковский, 2021); V Международной (XVIII Региональной) научной конференции «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2022); IV Международной научно-практической конференции «Современные проблемы радиобиологии, радиоэкологии и агроэкологии» (Обнинск, 2021); XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2020), II Международной молодежной конференции «Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве» (Обнинск, 2022, 2023).

Личный вклад автора. Автор принимала непосредственное участие во всех этапах исследования, начиная с рутинных процедур культивирования клеточных линий, оценки их выживаемости и пролиферации, метаболической активности, заканчивая отбором биологического материала для проведения молекулярно-генетических исследований с помощью ПЦР-РВ и анализа методом проточной цитометрии. Самостоятельно осуществляла сбор, статистическую обработку и интерпретацию полученных данных, на основе которых были сформулированы заключение и выводы исследования. Полученные в ходе исследования результаты оформлены в виде научных публикаций, доложены на международных и всероссийских научно-практических конференциях и симпозиумах.

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 30 научных работ, включая 7 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 23 тезиса докладов, представленных на научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа, представленная на 167 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 32 работы отечественных авторов и 133 публикации зарубежных исследователей. Иллюстративный материал диссертации состоит из 47 рисунков и 16 таблиц.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Данная глава посвящена анализу актуального состояния и перспектив адронной терапии, сфокусированному на методах лучевой терапии, использующих физические свойства тяжёлых заряженных частиц, таких как протоны и ионы ^{12}C . Представлен обзор литературных данных, описывающих молекулярные механизмы, определяющие радиорезистентность опухолевых клеток, с акцентом на роль опухолевого супрессора p53. Обоснован выбор доксорубина в качестве исследуемого противоопухолевого препарата, подробно описан его механизм действия, а также проанализированы современные исследования *in vitro*. Представлен анализ литературных источников, описывающих синергизм ионизирующего излучения и химиотерапевтических агентов, с упором на механизмы индуцированной клеточной гибели. Детально рассмотрены молекулярные механизмы, регулирующие программируемую клеточную гибель (апоптоз), включая внутренний и внешний митохондриальный пути, с особым вниманием к роли белка Noxa и ингибитора апоптоза Survivin.

1.1 Лучевая терапия опухолевых заболеваний

В современной онкологии лучевая терапия занимает лидирующие позиции в качестве метода лечения злокачественных новообразований. Ключевой задачей при этом является достижение максимального цитотоксического эффекта в опухолевых клетках и минимальное воздействие на окружающие нормальные ткани [27]. Лучевая терапия дифференцируется на две основные категории в зависимости от способа доставки ионизирующего излучения: внутреннюю (брахитерапия и радионуклидная терапия) и дистанционную. В первом случае терапия предполагает введение источников излучения в ткани или полости организма, тогда как дистанционная лучевая терапия подразумевает использование внешних источников излучения, располагающихся на некотором

расстоянии от опухоли. К последней категории относятся гамма-терапия, терапия тормозным излучением высокой энергии, а также брахитерапию с использованием близкофокусного рентгеновского излучения.

В рамках рассматриваемой темы, следует отметить, что эффективность данного метода лечения, основанного на использовании фотонов и электронов, может быть потенциально ограничена в клинических сценариях рядом факторов. В частности, одним из ключевых ограничений является ситуация, когда физические характеристики используемого излучения не позволяют обеспечить достаточную локализацию поглощенной дозы в пределах целевого объема, соответствующего опухолевому очагу [28]. Альтернативным решением рассматриваемой проблемы является использование пучков тяжелых заряженных частиц (ТЗЧ) [51, 88].

В настоящее время протонная и углерод-ионная терапия рассматриваются как одни из наиболее эффективных и точных методов лучевого лечения глубоко расположенных новообразований, включая опухоли, обладающие радиорезистентностью [98].

Необходимо отметить, что при проникновении в вещество ТЗЧ претерпевают постепенную потерю кинетической энергии, обусловленную процессом ионизации атомов среды. Распределение поглощенной дозы в среде, известное как кривая Брэгга, характеризуется следующей динамикой: первоначально наблюдается постепенное увеличение дозы с нарастанием глубины проникновения, затем происходит резкое возрастание дозы, формирующее так называемый «пик Брэгга», после чего поглощенная доза резко уменьшается практически до нуля (рисунок 1) [13].

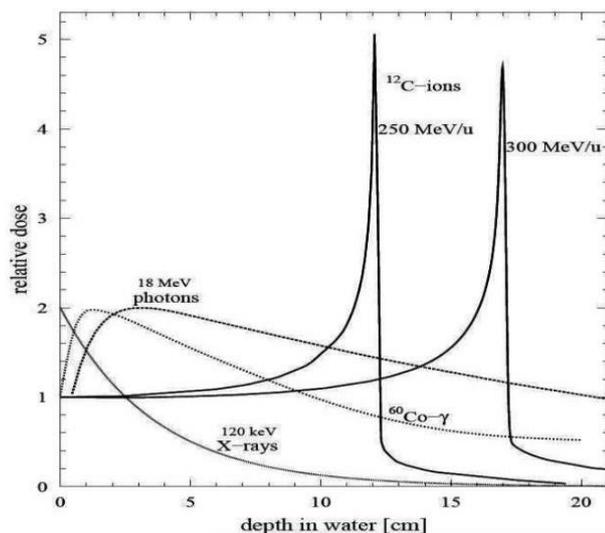


Рисунок 1 – Глубинные распределения поглощенной дозы разных видов излучений [13]

Возможность регулирования глубины проникновения пучка за счёт изменения энергии частиц позволяет осуществлять прецизионное сканирование опухоли, обеспечивая равномерное распределение дозы облучения в объёме опухоли при минимальном воздействии на окружающие здоровые ткани. Заслуживает внимания тот факт, что пик Брэгга для ионов ^{12}C значительно превосходит таковой для протонов, а относительная биологическая эффективность (ОБЭ) существенно выше. Принципиальным преимуществом лучевой терапии с использованием ионов углерода является высокая точность облучения опухоли, достигаемая за счет контролируемой глубины проникновения и субмиллиметровой точности позиционирования и сканирования пучка. Кроме того, данный метод обеспечивает минимальное повреждение здоровых тканей и высокую эффективность повреждения ДНК опухолевых клеток, независимо от уровня их оксигенации.

Одним из ограничений применения ТЗЧ в онкологической практике является их склонность к фрагментации с образованием осколков, обладающих большой проникающей способностью. Следствием данного эффекта, очевидно, является увеличение дозовой нагрузки на окружающие здоровые ткани. Концентрация фрагментов возрастает с увеличением глубины проникновения, достигая максимума в области пика Брэгга. За пределами пика Брэгга количество

осколков уменьшается, что обусловлено полной остановкой первичных ионов и прекращением процесса образования новых фрагментов [75, 78, 88].

Параметром, количественно характеризующим процесс взаимодействия заряженной частицы со средой, является линейная передача энергии (ЛПЭ). Она определяется как средняя энергия, переданная частицей при ионизации и возбуждении атомов среды на единицу пути в данной среде. ОБЭ проявляет положительную корреляционную зависимость от ЛПЭ: ее значения возрастают с увеличением ЛПЭ. Существенный подъем ОБЭ регистрируется начиная с ЛПЭ 10 кэВ/мкм, достигая своего максимума при 100 кэВ/мкм. После прохождения точки 100 кэВ/мкм отмечается обратная тенденция – снижение ОБЭ. Этот эффект объясняется достижением предела поглощающей способности клетки по отношению к передаваемой энергии [32].

Облучение ТЗЧ гипоксических участков опухолей создает существенное преимущество их применения в клинической практике. С целью характеристики радиорезистентности опухолевых тканей, обусловленной содержанием кислорода, используется понятие кислородного эффекта (КЭ). Согласно сложившимся представлениям, до 80% повреждений клеточных структур, вызванных редкоионизирующим излучением, обусловлены косвенным механизмом. Данный факт объясняет, почему фотонная радиотерапия нередко демонстрирует ограниченные терапевтические возможности при работе с радиорезистентными опухолями. На рисунке 2 визуализирована зависимость кислородного эффекта от линейной передачи энергии, при этом заштрихованный участок графика соответствует значениям кислородного эффекта, наблюдаемым в экспериментах с рентгеновским излучением [13].

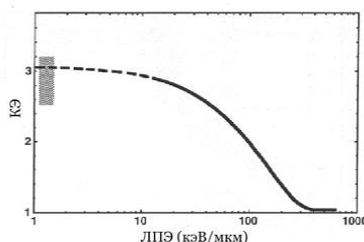


Рисунок 2 – Зависимость влияния кислородного эффекта на эффективность облучения от ЛПЭ [13]

Для редкоизирующих излучений КЭ может достигать значения 3, что означает трехкратное снижение эффективности облучения гипоксических клеток по сравнению с клетками, имеющими нормальное содержание кислорода. При значениях ЛПЭ, превышающих 100 кэВ/мкм, КЭ приближается к 1, что указывает на одинаковую эффективность плотноизирующего излучения как для нормальных, так и для гипоксических клеток.

При прохождении пучка ионов ^{12}C в веществе традиционно выделяют три характерные области на кривой Брэгга: область до пика с ЛПЭ $(10 - 16) \pm 1$ кэВ/мкм, область пика с ЛПЭ 180 ± 26 кэВ/мкм и область за пиком с ЛПЭ $\leq 20 \pm 1$ кэВ/мкм.

Величина ЛПЭ зависит от заряда ионов и их энергии, вследствие этого иизирующее излучение подразделяют на [32]:

- 1) плотноизирующее (ЛПЭ > 10 кэВ/мкм): α -излучение, нейтроны, ионы углерода и др.;
- 2) редкоизирующее (ЛПЭ < 10 кэВ/мкм): β -, γ -, рентгеновское излучение.

Установлено, что излучение с высокой ЛПЭ (α -излучение) обладает большей биологической активностью, чем излучение с низким значением (γ -кванты). При этом показано, что α -частицы производят меньше одонитевых и двунитевых разрывов. В свою очередь, комплексные повреждения ДНК, образовавшиеся при действии излучений с высокой ЛПЭ, репарируются медленнее по сравнению с излучением с низкой ЛПЭ [140].

Отличительной особенностью тяжелых ионов, обусловленной их большей массой по сравнению с протонами, является меньшая степень бокового рассеяния в процессе взаимодействия с веществом. В дистальной области траектории частицы наблюдается возрастание ЛПЭ, что приводит к формированию кластеризованных повреждений ДНК в клеточных структурах.

Иизирующее излучение, характеризующееся ЛПЭ в диапазоне от 1 до 5 кэВ мкм $^{-1}$, типичном для фотонного и протонного излучения, приводит к возникновению отдельных, дискретных актов ионизации в структуре хромосом. В

отличие от этого, ионы углерода с ЛПЭ до 100 кэВ мкм^{-1} и выше индуцируют многократные, плотно сгруппированные ионизационные события, включая множественные двойные разрывы ДНК, которые практически не поддаются репарации и приводят к летальному исходу клетки. Кроме того, наблюдаются множественные повреждения других клеточных органелл (рисунок 3) [30].

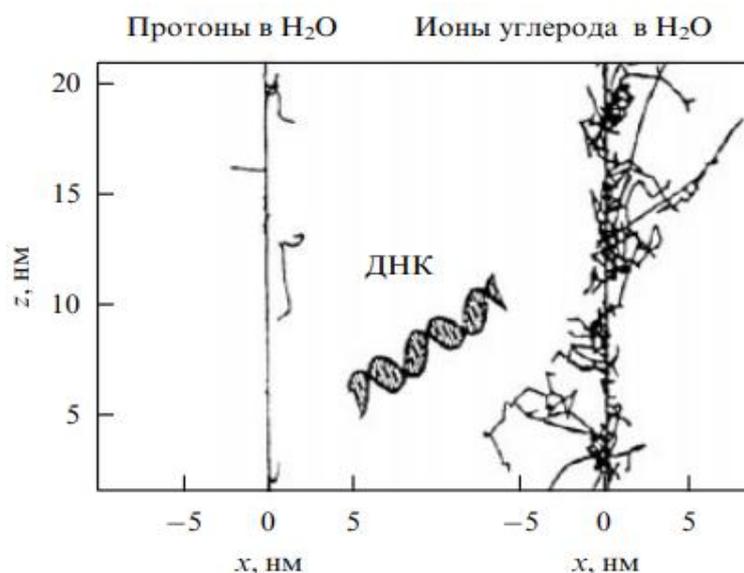


Рисунок 3 – Треки протона и иона углерода, демонстрирующие различную плотность актов ионизации [30]

Анализ представленных данных свидетельствует о высоком потенциале терапии тяжелыми заряженными частицами в онкологии, обусловленном высокой точностью облучения, достигаемой за счет контролируемого распределения дозы по кривой Брэгга, и повышенной биологической эффективностью, связанной с высокой линейной передачей энергии. Однако необходимо учитывать образование вторичных частиц и специфику репарации ДНК, индуцированной высокой ЛПЭ.

1.1.1 Современное состояние и перспективы развития адронной терапии

Статистический анализ заболеваемости злокачественными новообразованиями в Российской Федерации в 2024 году выявил 698 693 впервые зарегистрированных случаев. Гендерное распределение заболеваемости характеризуется следующим образом: у мужчин было диагностировано 322 198 случаев, у женщин – 376 495 случаев. Важно отметить, что наблюдается увеличение данного показателя на 3,6% в сравнении с данными, зарегистрированными в 2023 году, что отражает динамику роста онкологической заболеваемости в стране. Таким образом, «грубый» показатель заболеваемости составил 477,6 случая на 100 000 населения (расчет выполнен с использованием данных Росстата о среднегодовой численности населения за 2023 год), что, несомненно, превышает показатели 2023 года на 3,6% и значительно выше уровня 2014 года (на 23,1%). Что касается онкологической инфраструктуры, то в 2024 году в России функционировало 78 онкологических диспансеров (из них 77 имели стационары) и 2 специализированные онкологические больницы [10].

Учитывая, что ежегодная заболеваемость злокачественными новообразованиями в Российской Федерации превышает 600 000 случаев, и принимая во внимание преимущества данного метода, можно предположить, что не менее 10% пациентов могут быть потенциальными кандидатами на адронную лучевую терапию как часть комплексного лечения.

В настоящее время в мире функционирует около 70 установок, генерирующих синхротронное излучение, причем 17 из них представляют собой современные источники третьего поколения (США – 5, Германия – 4, Великобритания и Франция – по 2, Италия, Испания, Швейцария и Япония – по 1). На территории Российской Федерации синхротронные исследования осуществляются на базе Курчатовского специализированного источника синхротронного излучения «КИСИ-Курчатов» (г. Москва) и в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения (г. Новосибирск). При этом, КИСИ-Курчатов, являясь частью европейской сети мегасайенс-установок, выполняет

важную функцию по проведению предварительных экспериментов и подготовке исследований, реализуемых на зарубежных источниках, что, несомненно, вносит существенный вклад в развитие международного научного сотрудничества в данной области [19].

Следует подчеркнуть, что ускоритель У-70 служит платформой для разработки инновационных технологий в различных областях. В частности, ведутся работы по созданию перспективных энергетических стратегий, включая биомедицинские и технологии прямого преобразования энергии [19].

Научно-техническая программа РФ и Указ Президента РФ № 356 от 25 июля 2019 г. «О мерах по развитию синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры в Российской Федерации» прямо указывают на необходимость развития исследовательской базы для решения актуальных задач, в том числе в области медицины [18, 19]. Актуальность радиобиологических исследований, направленных на изучение механизмов ответа опухолевых клеток на различные виды облучения, напрямую вытекает из этой стратегической инициативы. Развитие синхротронных и нейтронных источников излучения, стимулируемое Указом, обеспечивает необходимую технологическую базу для проведения высокоточных радиобиологических экспериментов, что критически важно для совершенствования методов лучевой терапии, в том числе адронной, и повышения её эффективности.

1.1.2 Молекулярные механизмы радиационного ответа: роль ключевых генов

В контексте изучения механизмов апоптоза особое внимание заслуживает семейство белков Bcl-2, характеризующееся как про-, так и антиапоптотической активностью, что определяет их ключевую роль в регуляции клеточной гибели. [92].

Следует отметить, что преобладающее число исследований, посвященных идентификации молекулярных предикторов радиочувствительности, в настоящее время сосредоточено на анализе экспрессии генов, в частности, гена p53. Более того, значительная часть работ использует анализ генной экспрессии в качестве основы для выявления биомаркеров, предсказывающих ответ на лучевую терапию, при этом ген p53 фигурирует как один из наиболее часто изучаемых кандидатов [50, 67].

Наличие функционально активного белка p53 дикого типа необходимо для эффективной индукции апоптоза в клетках, чувствительных к ДНК-повреждающим факторам, в ответ на такие стимулы как облучение или цитотоксическое воздействие [56, 79, 138]. Это имеет прямое отношение к эффективности ионизирующего излучения и/или химиотерапии, поскольку p53 опосредует клеточный ответ на эти терапевтические воздействия.

Ключевым регулятором клеточного ответа на стресс является белок p53, функционирующий как супрессор опухолей. Он интегрирует сигналы, определяющие судьбу клетки, модулируя такие процессы, как остановка клеточного цикла, репарация повреждений ДНК, клеточное старение и апоптоз. [61]. Нарушение функции p53, напротив, ведет к геномной нестабильности, способствуя развитию опухолевых клеток, их инвазии и резистентности к терапии [126]. Мутантный p53, взаимодействуя с комплексами белков, такими как MRE11-Rad51-NSB и p73, способствует пролиферации опухолевых клеток [61]. Механизм регуляции клеточного цикла, осуществляемый белком p53, включает индукцию экспрессии белка p21. Последний, в свою очередь, ингибирует активность циклин-зависимых киназ, что приводит к остановке клеточного цикла в фазах G1 или G2 [103, 148]. Следовательно, путь p53/p21 играет существенную роль в регуляции клеточного цикла, старения и запрограммированной клеточной смерти.

Необходимо отметить, что к настоящему времени идентифицировано несколько сотен генов, транскрипционная активность которых регулируется белком p53. Данные гены вовлечены в широкий спектр клеточных процессов, включая регуляцию клеточного цикла, старения, апоптоза, метаболизма и

репарации ДНК [155]. Это свидетельствует о том, что ключевые функции p53 опосредуются его ядерной транскрипционной активностью. Необходимо отметить, что значительные исследовательские усилия сосредоточены на изучении p53-зависимого апоптоза и старения, поскольку эти процессы играют, предположительно, критическую роль в противоопухолевой защите [165].

Результаты исследования *in vitro* свидетельствуют о способности протонной терапии индуцировать апоптоз в гипоксических клетках линий LLC, HepG2 и Molt-4, что подтверждается морфологическими изменениями, фрагментацией ДНК и активацией каспаз [99]. Анализ показал повышение экспрессии p53, p21 и Bax, и снижение уровня Bcl-2 в гипоксических клетках после облучения. Эксперименты на клетках HCT116 с нокаутом p53 подтвердили необходимость p53 для индукции апоптоза. Повышенный уровень активных форм кислорода играл ключевую роль в процессе, причём антиоксидант N-ацетилцистеин предотвращал гибель клеток. Активация путей MAPK p38/JNK также участвовала в индукции апоптоза. В итоге, протонная терапия эффективно индуцировала p53-зависимый апоптоз в гипоксических опухолевых клетках через механизм, связанный с активацией путей MAPK p38/JNK.

Таким образом, белок p53 выполняет центральную роль в контроле клеточного ответа на повреждения ДНК, индуцированные ионизирующим излучением. Исследование механизмов регуляции p53 и его функционального взаимодействия с белками семейства Bcl-2 представляет собой перспективное направление в разработке стратегий повышения эффективности лучевой терапии.

1.2 Субкультура и клеточные линии

1.2.1 Культура клеток

Клеточная линия представляет собой популяцию клеток, полученных из первичной культуры посредством последовательных пассажей, направленных на

увеличение их количества. Характерной особенностью клеточной линии является преобладание клеток или клеточных линий с высоким темпом пролиферации и высокой степенью однородности клеточного состава [31].

С учетом способности к пролиферации, принято выделять два основных типа клеток: первичные (представляющие собой дифференцированные клетки, полученные непосредственно из ткани и характеризующиеся ограниченным пролиферативным потенциалом) и стволовые клетки (обладающие высоким потенциалом к пролиферации) [29].

Первичные опухолевые клетки (культура клеток) являются популяцией *ex vivo*, полученные путем механической резекции фрагментов опухолевой ткани [39]. Помимо клеток опухоли, первичные клеточные линии включают в себя клетки микроокружения: фибробласты, клетки эндотелия сосудов, Т-клетки [135].

В некоторых случаях клеточные линии могут давать начало постоянным клеточным линиям, называемым иммортализованными. Процесс, в результате которого происходят изменения в культуре, приводящий к возникновению иммортализованной клеточной линии, называют трансформацией. Трансформация возникает спонтанно или индуцируется химически или вирусом.

hTERT

Таргетная терапия онкологических заболеваний является современным подходом терапии, нацеленной на подавление работы генов (мишеней), активированных в опухолях. Одной из универсальных мишеней, встречающихся в различных типах клеток является теломераза, поддерживающая длину специализированных ДНК-белковых комплексов, состоящих из последовательностей TTAGGG, расположенных на концах хромосом в эукариотических клетках – теломер. Теломераза человека представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, предотвращающий укорочение хромосом при репликации ДНК и, как следствие, играющий ключевую роль в поддержании стабильности генома [57, 111]. Обладая теломеразной активностью, то есть способностью добавлять теломерные повторы к концам хромосом, теломераза

компенсирует их естественное укорочение при каждом делении. Теломеразный холофермент состоит из нескольких субъединиц:

- теломеразная РНК человека (hTR), служащая матрицей для синтеза теломерных повторов;
- обратная транскриптаза теломеразы человека (hTERT), каталитическая субъединица, отвечающая за синтез ДНК;
- ассоциированные белки, регулирующие активность теломеразы и длину теломер [47].

Важнейшими детерминантами активности теломеразы считается экспрессия hTERT, строго контролирующаяся различными молекулярными событиями, а также hTR (теломеразная РНК) [87]. Присутствие hTR отмечено во всех типах клеток, в то время как мРНК hTERT не обнаруживается в теломеразонегативных клетках [57]. Результаты исследований продемонстрировали, что экзогенное введение гена hTERT в нормальные клетки приводит к активации теломеразной активности, преодолению клеточного старения, увеличению продолжительности жизни клеток [118, 159]. Получение линии иммортализованных клеток нацелено на преодоление феномена клеточного старения. Эти подходы преимущественно фокусируются на модуляции экспрессии генов (hTERT, Vmi-1, HPVE6/E7, c-Myc.), влияющих на активность теломеразы. Данная стратегия направлена на активацию теломеразной активности, которая позволяет клеткам преодолеть процесс укорочения теломер и продлить их репликативный потенциал.

Таким образом, манипулирование экспрессией генов является ключевым элементом для создания бессмертных клеточных линий, которые могут быть использованы в исследованиях. Собственное исследование проводилось на культуре иммортализованных фибробластов человека линии hTERT.

MCF-7

Линия клеток MCF-7, полученная в 1973 году из первичной опухоли аденокарциномы молочной железы человека, обладает протоковым эпителиальным фенотипом и является ценной *in vitro* моделью для изучения

рецептор-позитивного (эстроген и прогестерон) рака молочной железы. Результаты исследований с ее использованием внесли значительный вклад в развитие как фундаментальных исследований рака молочной железы, так и в клинические исследования и оптимизацию терапевтических подходов для пациентов. Клетки MCF-7 представляют собой крупные адгезивные клетки, типичный размер которых составляет 20–25 микрон. Современная клеточная линия MCF-7 имеет кариотип, содержащий 69 хромосом.

Таким образом, в настоящую работу включен наиболее распространенный (70% диагностированных случаев) фенотип рака молочной железы, представленный клеточной линией MCF-7.

SK-N-BE(2)

SK-N-BE(2) – клеточная линия нейробластомы человека. В настоящее время считается, что она возникла из опухоли Аскина (семейство опухолей Юинга), клиническая картина, которой обусловлена наличием массивных опухолевых образований, распространяющихся в грудной полости и вовлекающих в патологический процесс органы средостения, плевру, легкие, грудную стенку. Мутации в передаче сигналов RAS/MAPK являются отличительной чертой нейробластомы высокого риска, а также определяют подгруппу пациентов с нейробластомой сверхвысокого риска и еще худшей выживаемостью. Поэтому целенаправленное лечение может быть действенной стратегией для лечения таких пациентов [116].

HeLa

В настоящем исследовании также была выбрана клеточная линия HeLa. Ввиду устойчивости клеток и быстрой скорости размножения линия HeLa считается бессмертной. Следует добавить, клетки данной линии широко применяются в медицинских исследованиях при разработке новых препаратов, в частности противоопухолевых.

HUN-7

HUN-7 – это бессмертная клеточная линия, состоящая из эпителиоподобных опухолевых клеток. Большинство клеток HUN-7 имеют число хромосом от 55 до 63. Стоит отметить, что клетки этой линии имеют точечную мутацию в гене p53.

1.3 Противоопухолевая активность химиопрепаратов

1.3.1 Молекулярные механизмы противоопухолевого действия доксорубицина

Доксорубицин относится к антибиотикам антрациклинового ряда и проявляет противоопухолевую активность посредством антимиотического и антипролиферативного действия. Данный препарат, широко используемый в химиотерапии, показан для лечения гематологических злокачественных новообразований (острый лимфобластный и миелобластный лейкозы) и солидных опухолей различной локализации (печень, желудок, поджелудочная железа, легкие, молочная железа, шейка матки, яичники) [40, 48, 91]. Химическая структура доксорубицина показана на рисунке 4.

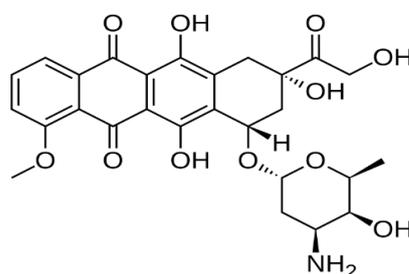


Рисунок 4 – Структура химиопрепарата доксорубицина [48]

Механизмы противоопухолевой активности данного соединения включают, в первую очередь, его способность нарушать синтез ДНК и РНК. Это происходит за счет интеркаляции молекулы, которая внедряется непосредственно в двойную

спираль ДНК, блокируя процессы репликации и транскрипции. Дополнительно, существующая информация позволяет предположить, что действие может осуществляться через другие пути, включающие нарушение целостности и функций клеточных мембран посредством взаимодействия с их липидными компонентами, а также через специфическое влияние на фермент топоизомеразу II, играющую критическую роль в метаболизме ДНК [29]. В конечном счете, это приводит к нарушению регуляции клеточного цикла и индукции апоптоза, что способствует подавлению роста опухолевых клеток [11, 113].

Два ключевых механизма определяют токсичность доксорубицина для здоровых клеток. Одним из них является образование комплекса доксорубицин- Fe^{2+} , способного к возникновению гидроксильного радикала и последующей инициации каскада реакций с участием свободных радикалов. Антрациклины способны стимулировать высвобождение ионов Fe^{2+} из ферритина посредством прямого взаимодействия с белком или через генерацию супероксид-анион радикала, тем самым потенцируя оксидативный стресс. Вторым механизмом токсического воздействия доксорубицина связан со способностью флавиносодержащих редуктаз (таких как цитохром-P-450 редуктаза, цитохром b₅-редуктаза, НАДН-дегидрогеназа и ксантин-оксидаза) восстанавливать хиноновую форму доксорубицина до семихинона. Семихиноновая форма доксорубицина, являясь свободным радикалом, способна восстанавливать молекулярный кислород до супероксид-анион радикала. В процессе данной реакции, наряду с образованием супероксид-анион радикала, происходит регенерация исходной хиноновой формы доксорубицина [26].

Существуют множество исследований, целью которых являлось изучение цитотоксичности при комбинированном действии доксорубицина и других факторов на нормальных и злокачественных клетках [12, 23, 36]. Также проведена оценка влияния химиотерапевтического агента доксорубицина и окислительного стресса, индуцированного кислородом и озоном, на показатели жизнеспособности культивируемых нормальных и злокачественных гепатоцитов [12]. Показано, что наибольшей цитотоксичностью обладает доксорубицин. Озон как изолированно,

так и в комбинации с доксорубицином также проявлял выраженную цитотоксичность. Кислород, напротив, повышал показатель жизнеспособности анализируемых клеток, но в сочетании с доксорубицином также подавлял ферментативную активность. Проводилось исследование тканевого распределения доксорубицина в форме конъюгата с нативной ДНК [23]. В ходе анализа выявлено, что существенная концентрация доксорубицина в исследуемой форме была обнаружена в опухолевой и лимфоидной тканях. При этом накопление препарата в паренхимотозных органах снижалось. Данная форма доксорубицина в меньшей степени вызывала поражения миокарда и кишечника по сравнению с обычным препаратом.

1.3.2 Скрининг противоопухолевых соединений *in vitro*

При определении оптимальной концентрации фармакологического агента, следует руководствоваться принципом достижения терапевтически значимых уровней, которые могут быть реализованы при использовании различных дозировок данного препарата в клинической практике. При сопоставлении данных об эффективной дозе исследуемого вещества, полученных в условиях *in vitro* и *in vivo*, целесообразно ориентироваться на верхний предел диапазона концентраций, обеспечивающий необходимую эффективность и минимизирующий риск развития нежелательных побочных эффектов [29].

Так, в большинстве клинических исследований *in vitro* традиционно используется часовой период экспозиции. Следует отметить, что данный временной интервал, как правило, считается достаточным для реализации цитотоксических эффектов алкилирующих препаратов, чье действие не является фазоспецифичным и проявляется на протяжении всего клеточного цикла. Между тем, общепринятая классификация химиотерапевтических агентов подразделяет их на фазоспецифичные и нефазоспецифичные соединения. В частности, доксорубицин относится к группе фазоспецифичных препаратов, чья

цитотоксическая активность максимально проявляется в S-фазе клеточного цикла, характеризующейся активной репликацией ДНК [14, 29]. В таких случаях, по-видимому, для достижения оптимального терапевтического эффекта может потребоваться более пролонгированный период воздействия.

Кроме того, необходимо принимать во внимание кинетику проникновения лекарственного средства в клетки. В этом контексте резистентность клеточной популяции после кратковременного периода воздействия может быть интерпретирована как результат нахождения значительной части клеток в нечувствительной фазе клеточного цикла на момент фармакологического воздействия. Существуют данные, что кратковременное воздействие доксорубицина на клетки линии НСТ-116 не зависит от фазы клеточного цикла. Однако при 24-часовой инкубации максимальная цитотоксичность наблюдалась в S-фазе [7].

При цитостатическом повреждении генетического материала опухолевых клеток активируются репаративные механизмы, такие как гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов одно- и двухцепочечных разрывов ДНК, осуществляемые при участии ДНК-зависимой протеинкиназы, а также киназ АТМ и АТР. Экспрессия генов, вовлеченных в процессы репарации, регулируется таким образом, чтобы ингибировать продвижение клеток по клеточному циклу, обеспечивая защиту от апоптоза.

Предполагается, что кратковременное воздействие доксорубицина может быть недостаточно эффективным из-за активации механизмов, обеспечивающих выведение препарата из клетки. К таким механизмам относятся ABC-транспортеры (ABCB1, ABCG2, ABCC1), обладающие широкой субстратной специфичностью, и система цитохрома P450, участвующая в метаболизме доксорубицина [44].

Исходя из вышеизложенного, представляется вероятным, что одночасовая экспозиция может оказаться недостаточной для достижения необходимой внутриклеточной концентрации доксорубицина в клетках, особенно учитывая его фазоспецифичный механизм действия. В связи с этим обстоятельством, в рамках

настоящего исследования, был выбран пролонгированный 24-часовой период инкубации клеток с данным фармакологическим агентом.

1.4 Комбинированная радио-химиотерапия: исследование синергизма

В контексте развития современных терапевтических стратегий в области медицинской радиологии исследование синергического взаимодействия ионизирующего излучения и химиотерапевтических агентов представляет собой актуальную исследовательскую задачу и предмет интенсивных научных изысканий [5, 11, 22, 121]. Принципиально важно отметить, что при взаимодействии двух факторов наблюдаемый биологический эффект может классифицироваться как синергический, превосходящий аддитивный эффект, ожидаемый от независимого действия каждого компонента по отдельности, или же как антагонистический [8, 20]. Кроме того, согласно имеющимся данным, было продемонстрировано, что оптимальная эффективность комбинированного действия зачастую достигается при одновременном действии терапевтических агентов [144].

1.5 Современное понимание механизмов клеточной гибели

В настоящем разделе представлен анализ литературных данных, касающихся механизмов регулируемой клеточной гибели (РКГ). Следует отметить, что особый акцент сделан на двух основных путях апоптоза: внутренний путь, активируемый различными внутриклеточными стрессовыми сигналами, и внешний путь, запускаемый факторами внеклеточного матрикса.

Обзор начинается с анализа регуляции митохондрий белками семейства Bcl-2 и последующего обсуждения каскада апоптоза, включая активацию каспаз. Далее представлен детальный анализ белка Noxa, представителя семейства BH3-

only белков. Проанализирована многогранная функция сурвивина, представителя семейства ингибиторов апоптоза.

1.5.1 Основные типы клеточной гибели

За последние десятилетия обширные экспериментальные исследования позволили детально изучить эволюционно консервативные генетические механизмы, лежащие в основе регулируемой гибели клеток (РКГ) [65]. Данный процесс, обеспечивающий элиминацию поврежденных, избыточных или потенциально опасных клеток, играет критическую роль в поддержании гомеостаза как в физиологических, так и в патологических состояниях. В контексте радиобиологических исследований, следует подчеркнуть, что РКГ опосредуется сложным комплексом молекулярных механизмов. В связи с этим, представляется, что РКГ может являться потенциальной терапевтической мишенью для фармакологических и генетических манипуляций, направленных на модуляцию скорости репарационных процессов и, как следствие, повышение чувствительности опухолевых клеток к лучевой терапии [63, 66].

Разработка унифицированных критериев для определения и классификации клеточной гибели на основе морфологических, биохимических и функциональных характеристик, осуществленная Номенклатурным Комитетом по Клеточной Гибели (NCCD), внесла существенный вклад в углубление понимания этого фундаментального биологического процесса. В контексте РКГ, следует отметить существование эндогенно иницируемых путей, не зависящих от внешних изменений микроокружения клетки. Эти внутренние программы клеточной смерти выполняют функцию интегральных компонентов физиологических процессов, таких как развитие и ремоделирование тканей. Данные процессы, протекающие без воздействия экзогенных стрессоров, определены как программируемая клеточная гибель (ПКГ). ПКГ представляет собой активный, генетически детерминированный процесс, включающий каскад

строго регулируемых молекулярных событий, ведущих к контролируемой деградации клеточных компонентов и, в конечном итоге, к гибели клетки [66].

Классификация клеточной гибели основывается на различиях в морфологических признаках, наблюдаемых макроскопически. Эти типы характеризуются разными механизмами удаления погибших клеток и их фрагментов [63, 65, 95]. Процессы апоптоза, аутофагии и некроза, являющиеся формами регулируемой клеточной гибели, отличаются по своим биохимическим и морфологическим проявлениям [62]. Несмотря на существующие методологические ограничения, морфологическая классификация клеточной гибели остается распространенной. Однако в свете непрерывного изучения новых сигнальных путей, регулирующих РКГ, предлагается пересмотренная классификация, основанная на молекулярных механизмах и функциональной значимости (рисунок 5) [65].

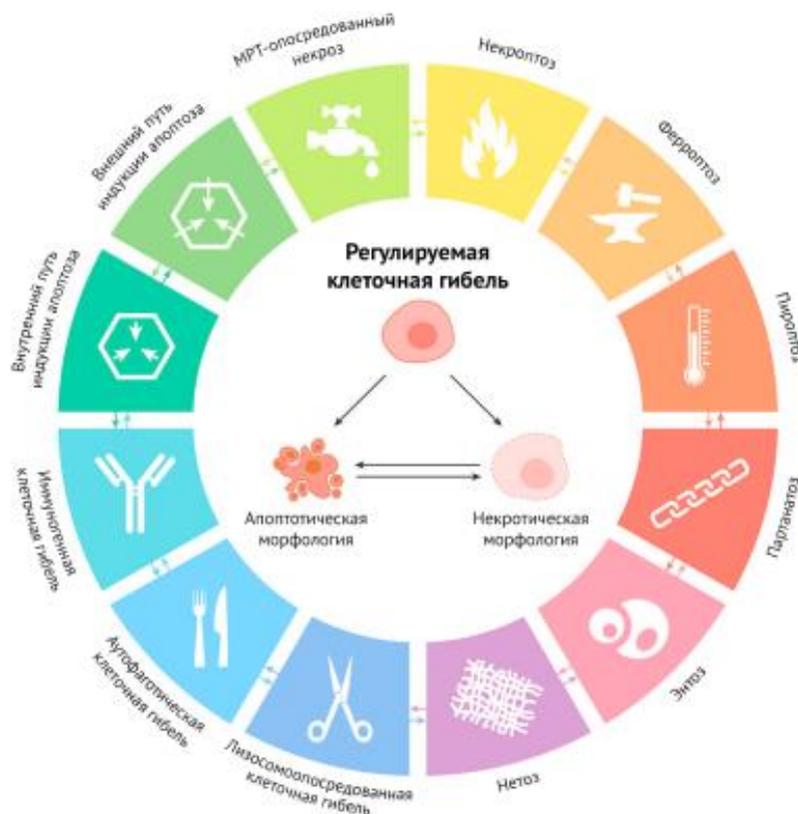


Рисунок 5 – Основные типы клеточной гибели [65]

Преимущественно внимание уделяется сигнальным путям, определяющим инициацию, исполнение и распространение РКГ, а также их патофизиологической роли.

1.5.2 Внутренний путь апоптоза

Внутренний путь апоптоза представляет собой вариант РКГ, который инициируется разнообразными внутриклеточными стрессовыми факторами [37, 122]. В результате апоптоза формируются апоптотические тельца, отличительной особенностью которых является сохранение целостности плазматической мембраны, а также частичное сохранение метаболической активности. Это особенность критически важна для *in vivo* утилизации данных структур. В результате, апоптотические тельца эффективно и быстро элиминируются фагоцитирующими клетками, такими как макрофаги, в процессе, известном как эффероцитоз [71].

Отсутствие фагоцитоза в клеточных культурах *in vitro* приводит к тому, что заключительная стадия апоптоза проявляется как вторичный некроз с разрушением плазматической мембраны [151]. Данное явление коррелирует с активацией гасдермина E (GSDME, также известного как DFNA5), формирующего поры в клеточной мембране [131].

Пермеабиллизация внешней мембраны митохондрий (MOMP) является критическим этапом внутреннего апоптотического пути [64, 147]. Контроль над этим механизмом осуществляется комплексом проапоптотических и антиапоптотических белков, принадлежащих к семейству Bcl-2. Эти белки объединены общим признаком – присутствием специфических участков, известных как домены гомологии Bcl-2 (BH-домены) [110].

Функционально семейство Bcl-2 подразделяется на два основных класса, антиапоптотические и проапоптотические белки, в зависимости от их активности и количества содержащихся BH-доменов (рисунок 6) [132].

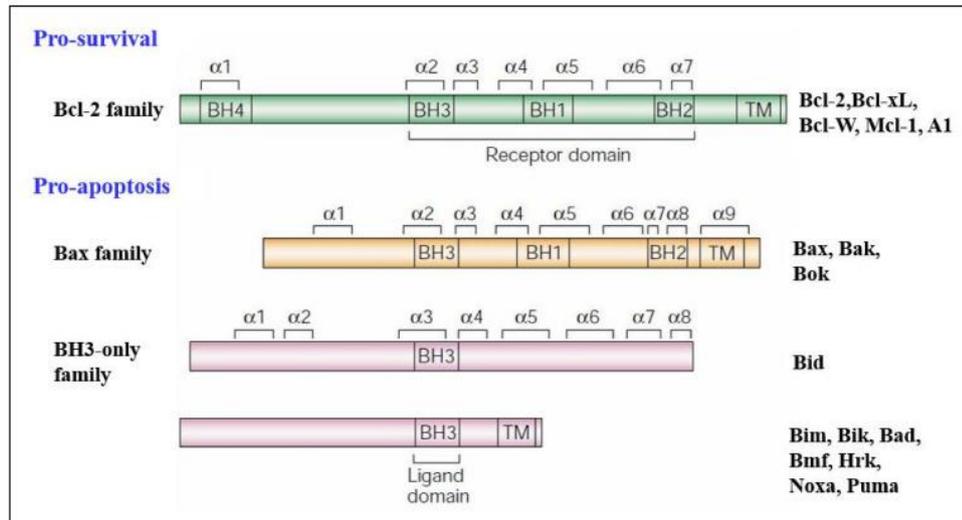


Рисунок 6 – Структурное сравнение белков семейства Bcl-2 [132]

Согласно данным, представленным на рисунке 6, белки семейства Bcl-2 можно разделить на две функциональные группы. Антиапоптотические белки, такие как Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 и A1, составляют первую группу и характеризуются наличием гомологичных BH-доменов (BH1-4), за исключением отдельных представителей, например, Mcl-1, лишенных BH4-домена. Интеграция данных белков во внешнюю митохондриальную мембрану позволяет им реализовывать свое действие [80]. Важно отметить, что многие антиапоптотические белки Bcl-2, включая Mcl-1, содержат трансмембранный домен (TM), обеспечивающий их специфическую внутриклеточную локализацию.

Проапоптотические белки образуют второй класс и подразделяются на семейства Bax и BH3-only. Семейство белков Bax, в состав которого входят Bax, Bak и Bok, реализует свой проапоптотический эффект посредством формирования олигомерных структур, приводящих к образованию пор во внешней мембране митохондрий. Как следствие данного механизма, наблюдается выход цитохрома C, что инициирует каскад реакций, ведущих к запрограммированной гибели клетки. В противовес этому, члены белкового семейства Bcl-2, обладающие антиапоптотической активностью, функционируют как ингибиторы, препятствуя выводу цитохрома C из митохондриального пространства. Это достигается путем подавления стимуляции проапоптотических белков Bax и Bak, которые ассоциированы с наружной мембраной митохондрий (ОММ). Данный механизм

основан на структурно-функциональной значимости ВН1, ВН2 и ВН3 доменов, которые формируют гидрофобный сайт связывания для ВН3-доменов проапоптотических белков семейства ВН3-only [43, 133]. В целом, физиологическая роль этих белков сводится к предотвращению неконтролируемого апоптоза путём нейтрализации действия проапоптотических факторов. Следует отметить, что все белки семейства ВН3-only характеризуются консервативным ВН3-доменом. При этом, некоторые члены данного семейства, включая Noxa, дополнительно содержат трансмембранный домен (ТМ), который, вероятно, влияет на их внутриклеточную компартиментализацию [132].

Семейство ВН3-only состоит из Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa и Puma, эти белки активируют Bax, Bak и Bcl в ответ на стрессовые сигналы. Активированные формы Bax и Bak затем олигомеризуются, что приводит к формированию тороидальных пор [104].

Накопленные в научной литературе сведения показывают, что белки, содержащие исключительно домен ВН3, обладают особой избирательностью в связывании с антиапоптотическими белками группы Bcl-2. Эта специфичность проявляется в том, что Bid, Bim и Puma способны связываться с большинством антиапоптотических белков Bcl-2. Так, Bid, Bim и Puma демонстрируют широкую способность к взаимодействию со всеми антиапоптотическими белками Bcl-2. В отличие от них, Bad преимущественно ассоциируется с Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-W, а Noxa проявляет высокую избирательность к Mcl-1 [42].

В контексте разработки противоопухолевых средств регуляция взаимодействия между про- и антиапоптотическими факторами семейства Bcl-2 представляет собой критически важный механизм, определяющий эффективность терапии. В частности, Bcl-2 служит мишенью для FDA-утвержденного ВН3-миметика венетоклакса (АВТ-199) и других разрабатываемых ингибиторов, таких как ингибитор Mcl-1 S63845 [94].

Как уже упоминалось, критическим событием в индукции апоптоза является увеличение проницаемости внешней митохондриальной мембраны, что приводит к высвобождению в цитозоль проапоптотических факторов [147]. В рамках

изучения молекулярных механизмов апоптоза, особое значение следует придать цитохрому С, который, помимо участия в дыхательной цепи в качестве переносчика электронов, играет ключевую роль в активации каспазного каскада. Также, важным представляется митохондриальный белок DIABLO, выполняющий функцию вторичного активатора каспаз посредством связывания с ингибиторами апоптоза [41, 49].

Цитохром С, действуя независимо от АТФ, участвует в формировании апоптосомы посредством ассоциации с Араf1 и прокаспазой-9 (Casp9). Эта макромолекулярная структура служит каталитической платформой для инициации активности Casp9. Впоследствии, активированная Casp9 осуществляет протеолитическое расщепление и активацию эффекторных каспаз, таких как Casp3 и Casp7 [90, 137].

Заслуживает внимания наблюдение, что, накопленные научные данные свидетельствуют о том, что эффекторные каспазы, хотя и существенно способствуют эффективности внутреннего пути апоптоза, не являются абсолютно незаменимыми для его протекания. Подавление их активации инициирует переход клеток к альтернативным механизмам клеточной гибели [63].

В заключение, установлено, что клетки, подвергшиеся кратковременному воздействию апоптогенных факторов, демонстрируют способность к выживанию при условии ограниченной МОМР и частичной активации эффекторных каспаз. Предполагается, что данное явление связано с механизмом анастаза, возникающим на грани между выживанием и гибелью клетки [86, 145]. Следовательно, фармакологические ингибиторы эффекторных каспаз могут не являться строго цитопротекторными агентами, а скорее эффективно переключают тип клеточной гибели.

Таким образом, в соответствии с предлагаемой NCCD классификацией, внутренний путь апоптоза следует определять как форму регулируемой клеточной гибели, инициируемой внутри- или внеклеточными сигналами, характеризующейся нарушением наружной митохондриальной мембраны и ускоряемой эффекторными каспазами.

1.5.2.1 Роль белка Noxa в регуляции апоптоза

Анализ литературных данных, представленный в разделе этой главы, фокусируется на роли проапоптотического белка Noxa, принадлежащего к семейству BH3-only, в механизмах апоптоза.

Белки семейства Bcl-2 играют важнейшую роль в контроле апоптотического пути. Белок, содержащий только BH3-домен, и индуцируемый Phorbol-12-мирикат-13-ацетатом белок 1 (Noxa), способен инициировать активацию различных сигнальных путей, приводящих к запрограммированной клеточной гибели. Этот процесс, вероятно, опосредован ингибированием антиапоптотического белка Mcl-1, а также других белков, участвующих в регуляции апоптоза. В конечном счете это приводит к активации ассоциированного с Bcl-2 белка X (Bax), гомологичного Bcl-2 антагониста-киллера (Bak) и основных белков ОММ [45, 70, 83].

Впервые Noxa был идентифицирован в 1990 году в ходе скрининга генов, вовлечённых в онкогенез клеток Т-клеточного лейкоза человека [82]. Авторы наблюдали быструю индукцию экспрессии нового транскрипта в мононуклеарных клетках периферической крови, эмбриональных клетках лёгких человека и клетках Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза Jurkat после стимуляции фторбол-12-мирикат-13-ацетатом (PMA), назвав его «PMA-чувствительным геном», позже переименованным в PMAIP1 (PMA-индуцированный белок 1) согласно номенклатуре HUGO (англ. Human Genome Organisation) [123]. Параллельно, в другом исследовании была клонирована гомологичная кДНК в облучённых рентгеновскими лучами эмбриональных фибробластах мыши, получившая название Noxa (от латинского «вред», «повреждение»), а её человеческий гомолог был найден в клетках Saos2 [115]. Несмотря на существование двух обозначений – PMAIP1 и Noxa, в большинстве современных публикаций, для удобства используется термин Noxa.

Структура гена Noxa человека относительно проста и включает три экзона и два интрона [156]. Однако его экспрессия демонстрирует значительную

сложность, обусловленную альтернативным сплайсингом, приводящим к образованию трёх различных изоформ. Каноническая изоформа (транскрипт 1), содержащая экзоны 1 и 3, кодирует белок Noxa из 54 аминокислотных остатков, причём ВНЗ-домен и трансмембранный домен закодированы в экзоне 3. Два варианта сплайсинга (NSV-1 и NSV-2) также содержат экзоны 1 и 3, но отличаются включением части (NSV-1) или полного (NSV-2) экзона 2. Вероятно, белки NSV-1 и NSV-2 состоят из 136 и 70 аминокислотных остатков, соответственно [156].

Несмотря на то, что ранние исследования указывали на p53 как на основной регулятор транскрипции гена Noxa, более глубокий анализ выявил значительно более сложную регуляторную сеть. Наблюдения на мышинных эмбриональных фибробластах продемонстрировали быструю индукцию мРНК Noxa в ответ на рентгеновское облучение в клетках дикого типа и с дефицитом IRF-1, в то время как в клетках эмбриональных фибробластах мышцы с нокаутом p53 этого эффекта не наблюдалось, что подтверждает p53-зависимую регуляцию [115]. Многочисленные последующие исследования, использующие *in situ* гибридизацию и обработку клеточных линий различными химическими веществами, подтвердили участие p53 в регуляции транскрипции Noxa [134].

Однако были также описаны p53-независимые механизмы регуляции. Так, ингибитор гамма-секретазы индуцировал экспрессию Noxa в клетках меланомы с нокаутом p53, а также в клетках PC-3 (простата) и Saos-2 (остеосаркома), лишённых функционального p53 [127].

Анализ субклеточной локализации белка Noxa, проведенный методом иммунофлуоресценции, показал его преимущественную локализацию в митохондриях при сверхэкспрессии в клетках [136]. Зарегистрирована локализация Noxa в эндоплазматическом ретикулуме в клетках меланомы, где его сверхэкспрессия приводила к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [81].

Следует отметить, что неспецифичность связывания белка Noxa с антиапоптотическими компонентами Bcl-2 семейства является подтвержденным

фактом, согласно результатам научной работы [77]. Исследования установили, что Noxa способен взаимодействовать с множеством мишеней. В частности, наблюдается корреляция взаимодействий с типом клеток и условиями экспериментов [77].

На основании всесторонних исследований, проанализированных в данном разделе, можно сделать вывод о том, что белки семейства Bcl-2, включая Noxa, играют ключевую роль в контроле апоптотических путей за счет модуляции взаимодействий между про- и антиапоптотическими белками. Анализ регуляции экспрессии Noxa продемонстрировал как p53-зависимые, так и p53-независимые механизмы, вовлекая в регуляцию различные факторы транскрипции. Кроме митохондриальной локализации, установлена локализация Noxa в эндоплазматическом ретикулуме с сопутствующим повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Механизм проапоптотического действия Noxa связан с индуцированной им деградацией Mcl-1 через протеасомный путь, при чём показано важное значение прямого взаимодействия Noxa с Mcl-1, а также роль E3-лигазы Mule/ARF-BP1 и C-концевой части BH3-домена Noxa.

1.5.3 Внешний путь апоптоза

Изменения во внеклеточной среде инициируют активацию внешнего пути апоптоза [59, 68, 141]. Данный сигнальный путь регулируется двумя классами рецепторов, локализованных на плазматической мембране: рецепторами смерти, активация которых требует взаимодействия лиганда и рецептора, и рецепторов зависимости, которые активируются при снижении концентрации лиганда ниже определенного критического уровня [34].

Внешний путь апоптоза протекает по двум различным механизмам. В клетках, классифицируемых как тип I, к которым относятся тимоциты и зрелые лимфоциты, Casp8 напрямую катализирует созревание эффекторных каспаз Casp3 и Casp7, что достаточно для индукции клеточной гибели. Напротив, в клетках

типа II (гепатоциты, β -клетки поджелудочной железы, опухолевые клетки), где активация Casp3 и Casp7 подавляется белком XIap, для полноценного запуска внешнего апоптотического пути требуется протеолитическое расщепление Bid посредством Casp8 [89].

Существует не менее 20 мембранных белков, относящихся к семейству рецепторов зависимости. В качестве примеров можно привести рецепторы нетрина DCC, UNC5A, UNC5B, UNC5C и UNC5D, рецептор нейротрофина NTRK3 и рецептор PTCN1 [68, 69].

Обращает на себя внимание двойственная роль рецепторов зависимости: при наличии достаточного количества лигандов они поддерживают клеточное выживание, пролиферацию и дифференцировку. Тем не менее, при уменьшении концентрации лиганда ниже определенного критического уровня, указанные рецепторы инициируют активацию альтернативных сигнальных путей, конечным результатом которых является гибель клетки. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих сигнальных каскадов, в настоящее время изучены не в полном объеме, хотя установлено их участие в регуляции активации каспаз [108].

В соответствии с вышеизложенным, рецепторы зависимости являются критическими регуляторами клеточного гомеостаза и программируемой клеточной гибели. Предложенная NCCD классификация определяет внешний апоптотический путь как форму регулируемой клеточной гибели, инициируемую изменениями внеклеточного микроокружения, которые детектируются плазмолеммальными рецепторами. Этот процесс усиливается активацией Casp8 (с возможным, но не обязательным, участием MOMP) и последующим каскадом, ведущим к активации эффекторных каспаз, преимущественно Casp3.

1.5.4 Ингибиторы апоптоза. Белок Survivin

На современном этапе развития онкологии, проблема развития устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим и таргетным

препаратам представляет собой серьезное ограничение, снижающее эффективность проводимого лечения у значительного числа пациентов. В связи с этим, актуальным направлением научных исследований является поиск новых молекулярных мишеней, модуляция активности которых позволит преодолеть лекарственную устойчивость. В данном контексте белок Survivin, кодируемый геном *BIRC5*, представляет собой перспективную терапевтическую мишень, модуляция активности которой может способствовать повышению эффективности противоопухолевой терапии [54, 158].

Исследование структурных характеристик Survivin, представителя семейства ингибиторов апоптоза, показало, что это белок с молекулярной массой 16,3 кДа, который состоит из 142 аминокислотных остатков. Белок кодируется геном *BIRC5* и находится на теломерном конце 17-й хромосомы (17q25) [157]. Его структура включает один домен BIR (baculovirus IAP repeat), что существенно отличает его от других членов семейства IAP. Заслуживает внимания отсутствие характерного для многих IAP С-концевого RING-пальцевого домена, что указывает на потенциальные различия в механизмах функционирования Survivin по сравнению с другими членами этого семейства [100].

В связи с ключевой ролью белка Survivin в регуляции апоптоза и клеточного цикла, а также его повышенной экспрессией в широком спектре опухолей, этот белок представляет значительный интерес в качестве потенциальной терапевтической мишени. В большинстве нормальных тканей взрослых организмов экспрессия Survivin, как правило, отсутствует или незначительна, что делает его привлекательной целью для разработки селективных противоопухолевых препаратов [60, 129, 139]. Повышенная экспрессия сурвивина представляет собой важный механизм формирования радиорезистентности и химиорезистентности, наблюдаемых при различных типах злокачественных новообразований [157].

Контроль над экспрессией Survivin, демонстрирующей выраженную циклическую зависимость от фазы клеточного цикла, осуществляется в основном на уровне транскрипции кодирующего его гена. Это проявляется в значительном

повышении уровня белка в G₂/M фазе и его резком снижении в G₁-фазе (рисунок 7) [139].

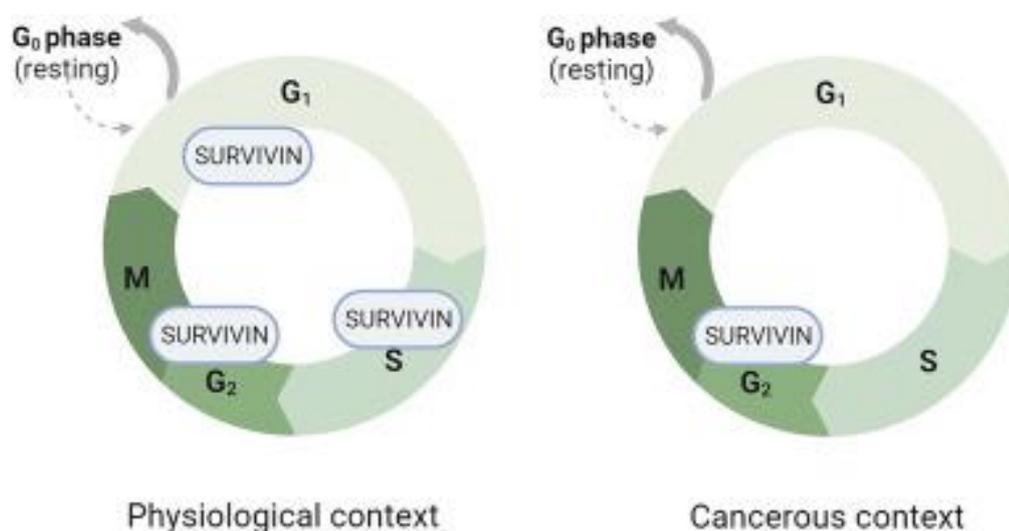


Рисунок 7 – Циклозависимость экспрессии Survivin в ходе клеточного цикла [139]

Глубокий анализ промоторной области гена сурвивина показал наличие множества сайтов связывания для проонкогенных факторов транскрипции. Это предполагает сложную регуляцию экспрессии, которая, вероятно, обусловлена взаимодействием с различными онкогенными путями и сигнальными молекулами, что может объяснить различия в уровнях его экспрессии в нормальных и злокачественных клетках. В ней идентифицированы зависимые от клеточного цикла элементы и области гомологии генов клеточного цикла, опосредующие временную регуляцию экспрессии гена. Кроме того, в этой области идентифицирован ряд однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs), включая -31G/C, -1547A/G, -625G/C и -644C/T. Примечательно, что полиморфизм -31G/C, часто встречающийся в опухолевых клетках, предположительно, приводит к повышенной экспрессии Survivin [128].

С учетом многообразия функций сурвивина в контроле апоптоза, было выдвинуто предположение о решающей роли его внутриклеточной локализации. А именно, цитоплазматическая локализация ассоциируется с ингибированием апоптоза, тогда как ядерная локализация связана с регуляцией митоза и функционированием хромосомного пассажирского комплекса (англ. chromosomal

passenger complex, CPC), функционирование которого является критическим для митоза, включая фосфорилирование мишеней, задействованных в конденсации хромосом, креплении микротрубочек к кинетохорам, активации контрольной точки сборки веретена (англ. spindle assembly checkpoint, SAC) и цитокинезе [38].

Различные сигнальные пути и связанные с ними молекулы играют ключевую роль в положительной и отрицательной регуляции сурвивина [157].

Стимуляция рецепторов тирозинкиназы инициирует активацию сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы PI3K/Akt, приводящую к негативной регуляции активности транскрипционных факторов семейства FOXO (FOXO1 и FOXO3a) [74]. Это приводит к снятию подавления транскрипции гена сурвивина. Более того, многие ростовые факторы (VEGF, Ang-1, IGF-1 и др.) стимулируют экспрессию сурвивина через этот путь, либо непосредственно активируя PI3K/Akt, либо ингибируя TGF- β [106].

Заслуживает внимания, что p53, опухолевый супрессор, оказывает негативное влияние на экспрессию сурвивина, регулируя его как на уровне транскрипции (через модификации хроматина промотора сурвивина и увеличение уровня p21, что приводит к гипофосфорилированию ретинобластомы и подавлению транскрипции E2F-зависимыми механизмами), так и на посттранскрипционном уровне [160].

В работе, проведенной с использованием базы данных Cancer Cell Line Encyclopedia, была установлена статистически значимая положительная корреляция между уровнями экспрессии генов *CYR61* и *BIRC5* [93]. Для выяснения роли сигнального пути Wnt/ β -катенина в регуляции экспрессии сурвивина, опосредованной *CYR61*, было проведено экспериментальное подавление экспрессии β -катенина, что привело к существенному снижению экспрессии сурвивина как на уровне транскриптов, так и на уровне белка. Кроме того, наблюдалась повышенная экспрессия *BIRC5* у пациенток с тройным негативным раком молочной железы, особенно у тех, кто получал химиотерапию, что коррелировало с увеличением экспрессии *CYR61*. Эти результаты позволяют предположить, что *CYR61* способствует развитию химиорезистентности путем

увеличения экспрессии сурвивина за счет активации Wnt/ β -катенин-зависимого сигнального пути.

Таким образом, значительное количество сведений, доступных о данной белке с момента его открытия, стало предметом пристального внимания биологов и специалистов в области онкологии. Благодаря доказанной роли в регуляции клеточного цикла, подавлении апоптоза и модуляции контрольных точек, сурвивин рассматривается как перспективная мишень для противоопухолевой терапии в течение последних двадцати лет.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Объектами настоящего исследования были выбраны опухолевые клетки следующих линий: MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HeLa (карцинома шейки матки), HUH-7 (гепатокарцинома), SK-N-BE(2) (нейробластома). В качестве объекта исследования также были выбраны нормальные клетки иммортализованных фибробластов человека линии hTERT. Клетки были получены в Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины (ФНКЦ ФХМ) – подразделения Федерального медико-биологического агентства (ФМБА). На рисунке 8 представлены объекты исследования.

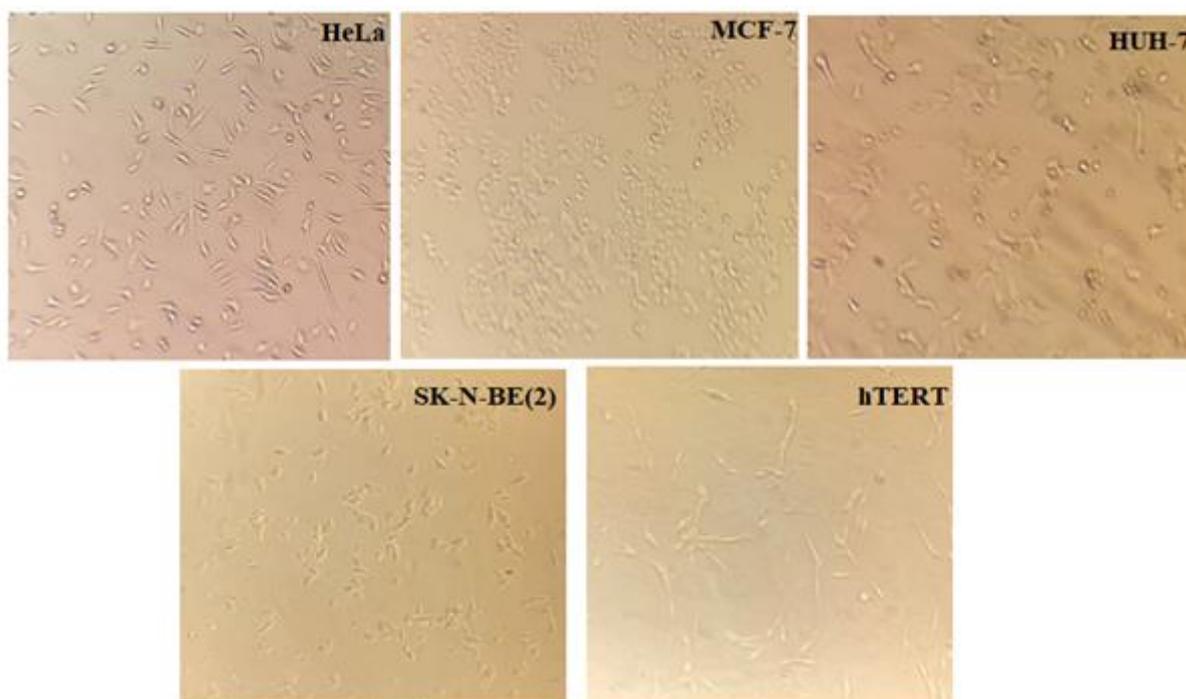


Рисунок 8 – Изображения клеточных линий, включенных в исследование, полученное на 3 сутки культивирования, увеличение объектива 40×

2.2 Культивирование клеток

В настоящем исследовании для культивирования клеточных линий использовался метод монослойной культуры. Методика работы с клеточными культурами предусматривала их выращивание *in vitro* в специализированных флаконах. В качестве питательного субстрата применялась широко используемая среда DMEM. Для предотвращения микробной контаминации в состав среды включали антибиотики: пенициллин (50 000 ед/л) и стрептомицин (50 мг/л) [15]. Процесс поддержания культур осуществлялся в автоматизированном CO₂-инкубаторе модели СВ 53, который поддерживал постоянную концентрацию углекислого газа на уровне 5%, что обеспечивало оптимальный уровень pH и необходимые физиологические условия для роста клеток [15]. Экспериментальные исследования проводились с использованием клеток на 3–5 пассажах, что обеспечивало стабильность фенотипических характеристик.

2.3 Обработка клеток противоопухолевым препаратом

В качестве исследуемого препарата был выбран доксорубин (Фармахеми Б.В., Нидерланды). Выбор доксорубина обусловлен его потенциальной эффективностью в отношении более широкого круга злокачественных новообразований.

Клетки предварительно были обработаны доксорубином в концентрации 0,004 мг/мл в течение 24 ч, после чего подвергнуты облучению [2].

В предварительном исследовании *in vitro* была определена полумаксимальная ингибиторная концентрация (IC₅₀) доксорубина в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,01 мг/мл для исследуемых клеточных линий с использованием анализа МТТ. Для проведения экспериментов осуществляли посев клеточной суспензии объемом 100 мкл в каждую лунку 96-луночных планшетов, при этом начальная плотность клеток составляла 10 000 клеток на

лунку. К клеточной суспензии добавляли химиопрепарат доксорубицина в концентрациях: 0,001, 0,002, 0,004, 0,008, 0,01 мг/мл и инкубировали 24 ч. Полученные данные показали, что IC_{50} доксорубицина составляет 0,004 мг/мл. Учитывая это, концентрация 0,004 мг/мл выбрана для последующих экспериментов как релевантная концентрация, обеспечивающая выраженный цитотоксический эффект без чрезмерного подавления клеточного роста, что позволяет изучить оптимальный баланс между терапевтическим эффектом и клеточной токсичностью.

2.4 Условия облучения

Облучение клеток на ускорителе ионов У-70. Протокол облучения клеточных культур ионами ^{12}C был реализован на экспериментальной установке У-70, функционирующей на базе Института физики высоких энергий (ИФВЭ) ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт» (г. Протвино). Процедура облучения проводилась в водном фантоме при средней энергии пучка 455 МэВ/ нуклон. Линейная передача энергии излучения на начальном участке составляла 11 кэВ/мкм, а в области пика Брэгга достигала 120–140 кэВ/мкм. Опухолевые клетки облучали в пике Брэгга в диапазоне доз от 2 до 10 Гр [16].

Принимая во внимание геометрию пучка, рассеяние облучения за счет фрагментации и формирования осколков деления, а также физические свойства излучения: часть излучения выходит за пределы области, где ожидается максимальная доза, и, как следствие, облучаются окружающие ткани, включая нормальные клетки, облучение фибробластов происходило в хвосте пика Брэгга в диапазоне доз от 2 до 10 Гр [16].

Облучение клеток на гамма-установке радиационного облучения «ГУР-120». Клеточную суспензию подвергали воздействию γ -излучения. В качестве источника использовался радиоактивный изотоп ^{60}Co , испускающий гамма-кванты с энергией 1,25 МэВ, что соответствует стандартным параметрам данной

установки, расположенной в НИЦ «Курчатовский институт» ФГБНУ «ВНИИРАЭ». Облучение осуществлялось при мощности дозы 0,9 Гр/мин. Диапазон доз облучения, применявшийся в экспериментах, варьировался от 2 до 10 Гр для злокачественных и нормальных клеток [16].

Конструкция установки ГУР-120 предусматривала восемь излучающих блоков. Блоки были расположены попарно (четыре напротив четырех) и содержали источники гамма-излучения ^{60}Co типа ГИК-7-4, суммарная паспортная активность которых составляла $4,47 \times 10^{15}$ Бк. Дозиметрический контроль осуществлялся с использованием универсального дозиметра ДКС-101, оснащенного ионизационной камерой БМК-50. Для обеспечения равномерного облучения образцов клетки располагались на строго выверенном расстоянии от источника излучения.

Эксперименты по облучению клеток протонами были выполнены на протонном терапевтическом комплексе «Прометеус», который базируется на площадке Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба (филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России). Облучение клеток осуществлялось посредством сканирующего пучка протонов в интервале доз от 2 до 10 Гр. Энергия протонов составляла 100 МэВ, а воздействие проводилось в центральной области распределенного пика Брэгга на исследуемые опухолевые клеточные линии [14]. Облучение проводили с одного направления. Нормальные клетки линии hTERT облучали в хвосте пика Брэгга в тех же дозах.

В экспериментах образцы подвергались облучению в режиме облучения Chip Irradiation с энергией протонного пучка 100 МэВ. Модифицированный пик Брэгга, характеризующийся шириной 1,5 см, использовался для формирования пространственного распределения дозы. Размеры поля облучения составляли $6,5 \times 6,5 \text{ см}^2$. С целью обеспечения однородности дозного распределения в латеральной плоскости, наложение пучков производилось с равномерным шагом, равным $0,7\sigma$. Дозиметрическая верификация проводилась для подтверждения точности распределения дозы. Для этой цели был задействован водный фантом MP3-P (PTW Freiburg, Германия). Измерительный комплекс включал

плоскопараллельную ионизационную камеру Advanced Markus (PTW Freiburg, Германия) и двухканальный электрометр Tandem XDR (PTW Freiburg, Германия). Ионизационная камера устанавливалась в водный фантом таким образом, что ее референтная точка (нулевое положение) располагалась на 20 мм от внутренней поверхности входного окна фантома (с учетом водонепроницаемой насадки). Пространственное выравнивание всей системы, состоящей из водного фантома и измерительной камеры, достигалось с помощью лазерных целеуказателей по трем координатным осям. Глубинные дозовые распределения получали посредством повторных запусков плана облучения. Определение поглощенной дозы для заданного уровня осуществлялось при установке опорной точки на расстоянии 46 мм от нулевого положения, соответствующем середине модифицированного пика. При облучении в простреле, объекты располагались в специализированном порядке вдоль аксиального направления, по три экземпляра, на расстоянии 56,5 мм от выпускного канала. В случае облучения в пике, объекты размещались на специализированной оснастке по три в ряд, внутри водного фантома. Позиционирование всех объектов в зоне облучения осуществлялось с использованием лазерных центраторов для обеспечения точного и воспроизводимого положения.

2.5 Методика проведения эксперимента

Перед началом экспериментальных манипуляций, адгезированные клетки, находящиеся в монослойной культуре, подвергались процессу дезинтеграции с поверхности культурального флакона. С этой целью использовался раствор Трипсина-Версена в объемном соотношении 1:1. После отделения от поверхности, клетки ресуспендировали в полной культуральной среде DMEM с целью нейтрализации остаточной активности трипсина и обеспечения клеток необходимыми питательными веществами. Осуществляли подсчет количества клеток с использованием камеры Горяева и, при необходимости, проводили

разведение суспензии до заданной концентрации 50 000 кл/мл. Клеточная суспензия аликвотировалась в стерильные полипропиленовые пробирки типа Эппендорф в объеме 1,5 мл для последующего облучения. С целью поддержания стабильности клеточных образцов и минимизации метаболической активности клеток в процессе транспортировки пробирки с клеточной суспензией помещались в контейнер с тающим льдом, что позволяло поддерживать температуру, близкую к 0°C.

Настоящее исследование предусматривало создание нескольких экспериментальных серий. В частности, были выделены группы клеток, обработанные доксорубицином в концентрации 0,004 мг/мл, а также образцы, подвергшиеся воздействию ионизирующего излучения. Дополнительно была сформирована группа, подвергшаяся комбинированному действию двух агентов. Отдельно была предусмотрена контрольная группа.

2.5.1 Оценка ОБЭ

В контексте оценки биологического влияния ионизирующего излучения используется такой параметр, как относительная биологическая эффективность (ОБЭ). В качестве эталонного излучения применяется γ -излучение. Причина введения ОБЭ обусловлена разницей в поражающем действии одинаковых доз разных излучений. Относительная биологическая эффективность формулируется следующим образом [32]:

$$ОБЭ = \frac{D_{\text{станд.}}}{D_{\text{иссл.}}}, \quad (1)$$

где $D_{\text{станд.}}$ – поглощенная доза эталонного излучения (γ -излучения), требуемая для достижения определенного биологического эффекта,

$D_{\text{иссл.}}$ – поглощенная доза исследуемого ионизирующего излучения, достаточная для достижения эквивалентного биологического эффекта по сравнению с эталонным излучением.

Оценку ОБЭ проводили на прямолинейном участке кривой доза-эффект.

2.5.2 Расчет коэффициента взаимодействия исследуемых агентов

В ответ на комбинированное воздействие двух факторов, таких как ионизирующее излучение и физический или химический агент, на биологические системы, выделяют три возможных типа взаимодействия индуцируемых повреждений: аддитивное, синергическое и антагонистическое.

Количественное определение синергического взаимодействия в настоящем исследовании было выполнено посредством расчета соответствующего коэффициента взаимодействия k [21]:

$$k = \frac{D_2}{D_1} \quad (2)$$

где D_1 представляет собой дозу, вызывающую эффект при совместном действии двух агентов, а D_2 является дозой, при которой ожидается эффект такой же величины в случае аддитивного взаимодействия агентов.

Предложенный коэффициент отражает кратность, с которой наблюдаемый эффект комбинированного воздействия двух агентов отклоняется от величины, предсказанной аддитивной моделью, основанной на суммировании эффектов каждого агента в отдельности. Если величина полученного коэффициента больше единицы, то говорят о синергическом взаимодействии двух факторов, если меньше, то регистрируют антагонизм.

2.5.3 Определение клоногенности

Для оценки способности клеточных популяций к формированию колоний после стрессорного воздействия применяется метод клоногенного анализа *in vitro*. Данная методика базируется на принципе, основой которого служит способность одной клетки инициировать формирование клеточной колонии [52].

Согласно методике, по завершению облучения клетки переносили в стерильные чашки Петри для дальнейшего культивирования. Начальная плотность варьировалась от 1000 до 100 000 клеток, что было непосредственно обусловлено примененной дозой ионизирующего излучения. Последующие манипуляции заключались в следующем [11]:

1. Клеточные культуры подвергались контролируемому инкубированию в течение интервала, охватывающего от 7 до 14 суток. Данный период был эмпирически установлен как оптимальный для достижения необходимой степени пролиферации.
2. Основным результатом этого культивирования являлось образование колоний, отчетливо различимых невооруженным глазом.
3. Для последующей оценки, колония была определена как скопление пролиферирующих клеток, которое обладало минимальным диаметром не менее 0,75 мм.
4. По завершении установленного инкубационного периода, жидкая культуральная среда была тщательно удалена.
5. Образовавшиеся колонии подвергались фиксации. Для этого применялся 95% раствор этилового спирта.
6. После процедуры фиксации колонии были подвергнуты процедуре окрашивания 2% раствором метиленового синего в 50% этаноле [73].
7. В процессе подсчета выживших клеток для анализа принимались во внимание только колонии, включающие более 50 индивидуальных клеток.
8. Клоногенная способность культур выражалась в процентах, представляя собой отношение числа колониеобразующих клеток к общему

количеству высеянных клеток в каждой опытной группе (в зависимости от дозы облучения) и нормализовалась с учетом выживаемости клеток в контрольных образцах.

2.5.4 Определение времени удвоения

Время удвоения отражает временной интервал, необходимый для экспоненциального увеличения численности популяции клеток вдвое. Определение времени удвоения проводилось в течение логарифмической фазы роста, например, при увеличении числа клеток с 1×10^6 до 2×10^6 .

Методология заключалась в следующем [11]:

1. Непосредственно после завершения этапа облучения, клетки подвергались процедуре переноса в стерильные чашки Петри. Концентрация клеток была унифицирована для всех экспериментальных образцов и составила 10 000 клеток на каждую чашку.

2. После этого клеточные культуры инкубировались в течение 24 ч.

3. По истечении установленного периода культивирования, жидкая среда была тщательно удалена из каждой экспериментальной чашки Петри.

4. Клетки, прикрепленные к поверхности субстрата, подвергались процедуре отмывки с использованием раствора Трипсина-Версена.

5. Для эффективного отделения клеток от культурального субстрата, после промывки в каждую чашку Петри добавляли 1 мл раствора Трипсин-Версена. После этого чашки инкубировали при контролируемой температуре в течение получаса.

6. Клетки, открепленные от адгезионного субстрата, были ресуспендированы, а их численность определена в камере Горяева. Методология расчета времени удвоения заключалась в следующем:

$$TD = tp \times \frac{\log 2}{\log\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}, \quad (3)$$

где tp – время культивирования, N_1 – начальное количество клеток, тогда как N_2 – конечное количество клеток.

2.5.5 Анализ метаболической активности клеток (МТТ-тест)

Для оценки метаболической активности клеток был использован колориметрический метод. Принцип метода основан на редокс-реакции, катализируемой митохондриальными дегидрогеназами. В ходе реакции происходит восстановление желтого тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) до формазана. Формазан представляет собой пурпурно-синие кристаллы, нерастворимые в водной среде, однако способные растворяться в диметилсульфоксиде (ДМСО) [33, 97, 124]. Благодаря своим липофильным боковым группам и положительному суммарному заряду МТТ проникает через клеточную мембрану и восстанавливается в жизнеспособных клетках под действием митохондриальных ферментов или ферментов клеточной плазмы, таких как оксидоредуктазы, дегидрогеназы, оксидазы и пероксидазы, используя NADH, NADPH, сукцинат или пируват в качестве доноров электронов.

Для проведения эксперимента была приготовлена суспензия клеток концентрацией 100 000 клеток в 1 мл питательной среды DMEM. Суспензию клеток помещали в 96-луночные планшеты в объеме 100 мкл на лунку. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч. По истечении этого периода, в каждую лунку добавляли 20 мкл рабочего раствора МТТ, после чего инкубировали 2 ч. Далее культуральная среда была удалена, и в каждую лунку вносили раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Измерение оптической плотности (ОП) каждой лунки осуществлялось при 530 нм с референсным вычитанием

поглощения при 630 нм, используя планшетный фотометр Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия). Вычисление фракции выживших клеток осуществлялось следующим образом (4):

$$\frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%, \quad (4)$$

где ОП – это показатель оптической плотности.

Значение стандартного отклонения было вычислено согласно представленной формуле (5):

$$\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})}{(n-1)}}, \quad (5)$$

где x – это среднее значение выборки, составленной из отдельных измеренных величин, а n – указывает на количество элементов в этой выборке.

2.5.6 Анализ жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии

Метод проточной цитометрии основан на гидродинамическом фокусировании (организованный поток жидкости) суспензии флуоресцентно-меченых клеток в проточной ячейке. Последовательность основных этапов цитометрического анализа заключается в следующем: окрашивание проб флуоресцентными красителями, регистрация оптических параметров клеток с последующим преобразованием в проточной ячейке световых сигналов в электронные [9].

Для оценки жизнеспособности клеток в настоящей работе использовали краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD), характеризующийся высоким сродством к участкам GC и способностью интеркалироваться в двухцепочечную молекулу ДНК [163]. Преаналитический этап работы проведен в соответствии с

протоколом «Flow cytometry (FACS) staining protocol (Cell surface staining)» Yale Flow Cytometry [58]. Выполнение аналитического этапа работы осуществлялось на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США).

2.6 Анализ генетических механизмов ответа на ионизирующее излучение

2.6.1 Выбор генов-кандидатов для проведения исследования

Для определения функциональных аннотаций генов и выявления их участия в биологических процессах использовался биоинформационный подход, основанный на анализе данных из открытой базы данных UniProt [150]. Процедура включала поиск по базе данных UniProt с использованием идентификаторов белков и генов, извлечение информации о функциональных аннотациях (с указанием названия гена в UniProt) и определением участия соответствующих белковых продуктов в биологических процессах. Полученные данные содержали информацию о функции гена и его вовлеченности в специфические биохимические пути и молекулярные сети [162].

2.6.2 Разработка праймеров для ПЦР в реальном времени

Дизайн праймеров для проведения реакции обратной транскрипции мРНК в кДНК, а также для последующей количественной ПЦР в режиме реального времени, осуществлялся с использованием биоинформатических инструментов на основе генетических последовательностей, представленных в формате FASTA. Для оптимизации праймеров и исключения неспецифического связывания применялся алгоритм поиска по гомологии (BLAST), обеспечивающий высокую специфичность и эффективность амплификации целевых генов (рисунок 9) [55].

Рисунок 9 – Поиск информации об исследуемых генах в базах данных NCBI Gene и GenBank [112]

Рекомендуется придерживаться следующих требований для подбора праймеров при постановке ПЦР-РВ:

1. Значение температуры плавления (T_m) определяется нуклеотидной последовательностью олигонуклеотидных праймеров. Важным критерием при подборе праймеров является минимизация разницы в значениях T_m для прямого и обратного праймеров, которая не должна превышать 2°C .

2. Показатель самокомплементарности (self-complementarity). Для обеспечения эффективного отжига и специфичности ПЦР-амплификации, праймеры должны быть сконструированы таким образом, чтобы минимизировать образование внутренних вторичных структур (шпилек) и межмолекулярных взаимодействий (праймер-димеров), способных конкурировать с целевым фрагментом ДНК. Область связывания праймеров должна быть свободна от известных генетических вариаций (мутаций, делеций или инсерций) в пределах заданной специфичности (например, видовой или таксономической). Присутствие таких вариаций в сайте отжига праймера может существенно снизить эффективность гибридизации или полностью ингибировать её, что приводит к ложноотрицательным результатам амплификации.

3. Средняя длина праймеров: 18–25 нуклеотидов.
4. При дизайне праймеров следует учитывать ГЦ состав: оптимален при 40–60%.
5. Оптимальная длина продукта: от 200 до 600 нуклеотидов.

Полные нуклеотидные последовательности, использованных в исследовании праймеров, и целевые гены приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для оценки экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ

Ген	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>BIRC5</i>	ССАСТGAGAACGAGCCAGACTT	GTATTACAGGCGTAAGCCACCG
<i>GAPDH</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<i>PMAIP1</i>	ССAGCCGCCAGTСТААТСА	GTGCCCTTGGAACGGAAGA

Синтез олигонуклеотидов, представляющих собой праймерные последовательности, был выполнен компанией ЗАО «Евроген» (Россия) с использованием стандартных методов химического синтеза олигонуклеотидов.

2.6.3 Выделение РНК

Для выделения РНК из исследуемых образцов использовался коммерческий набор RNA Solo (Евроген, Россия). Процедура выделения РНК проводилась в соответствии с рекомендациями производителя, изложенными в прилагаемом протоколе. Данная система включает в себя два основных функциональных модуля: модуль, предназначенный для экстракции РНК, и модуль для обработки образцов ДНКазой I, направленный на элиминацию контаминирующей ДНК [14].

После облучения культуры клеток доставляли в лабораторию при температуре тающего льда. К находящимся в состоянии суспензии клеткам в объеме 1,5 мл добавляли равный объем фосфатно-солевого буфера. Пробирку с биоматериалом центрифугировали в течение 5 мин при 3000 g на настольной центрифуге 5415 R Eppendorf (Eppendorf, Германия) (рисунок 10).



Рисунок 10 – Этап подготовки проб для получения РНК

Последовательность этапов включала лизис образца, центрифугирование, обработку связывающим раствором С, промывку и удаление ДНК с последующей элюцией РНК. Полученную РНК хранили при температуре от -25 до -15°C до использования.

2.6.4 Количественная оценка РНК с помощью спектрофотометрии

Количественная оценка концентрации и чистоты выделенной РНК осуществлялась с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США). Преимущество данного прибора состоит в высокоточном и воспроизводимом измерении проб объемом 1 мкл. Измерение происходит в капле раствора, зафиксированной за счёт поверхностного натяжения между верхним и нижним измерительными пьедесталами.

Количественное определение РНК проводили спектрофотометрически на приборе в режиме «RNA-40» (рисунок 11).

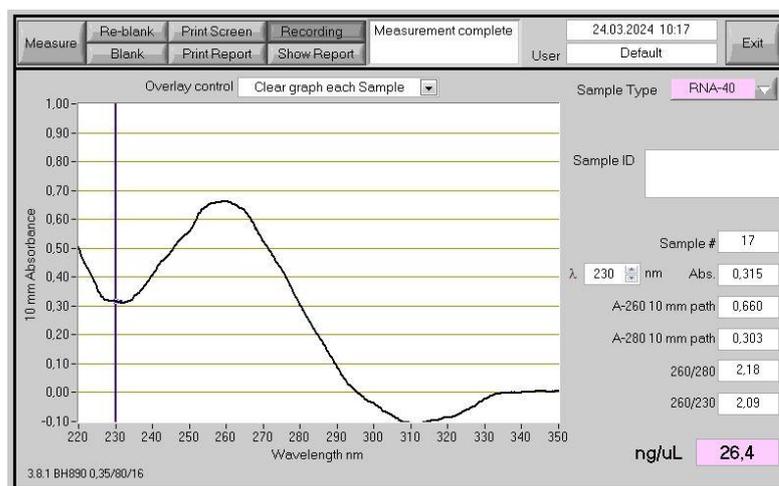


Рисунок 11 – Количественная оценка РНК в программе The NanoDrop 1000

Методика измерения концентрации РНК включала использование 2 мкл исследуемого раствора, с обязательной промывкой пьедестала между последовательными измерениями. Для количественной оценки РНК использовался спектрофотометрический метод, основанный на измерении поглощения при 260 нм. Контроль качества и чистоты изолированной РНК осуществлялся посредством анализа специфических спектрофотометрических показателей, представляющих собой отношения оптической плотности при различных длинах волн:

- $A_{260/280}$ – это соотношение коэффициентов поглощения при 260 и 280 нм. Обычно чистой считается РНК, имеющая соотношение $A_{260/280} \geq 2,0$. Соотношение меньше 2,0 указывает на то, что образец загрязнен белком, фенолами или другими соединениями;
- $A_{260/230}$ – это соотношение обычно выше, чем $A_{260/280}$ для того же образца и должно находиться в диапазоне от 1,8 до 2,2. Значения меньше заданного диапазона указывают на наличие загрязнителей в полученном образце РНК.

2.6.5 Проведение ПЦР-РВ

После процедуры выделения суммарной РНК на микроцентрифужных колонках с последующей количественной оценкой на спектрофотометре NanoDrop, был выполнен одноэтапный анализ РНК методом ПЦР-РВ. В качестве детектора амплификации использовался интеркалирующий краситель SYBR Green I. Процедура проводилась в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, с использованием набора OneTube RT-PCR SYBR (Евроген, Россия).

Методологически, данный подход основан на совмещении обратной транскрипции и ПЦР-РВ в одной реакционной смеси, что обеспечивается использованием термостабильной ревертазы и ДНК-полимеразы с «горячим стартом», ингибированной до достижения оптимальной температуры для амплификации. Состав набора SK032S показан в таблице 2.

Таблица 2 – Компоненты коммерческого набора OneTube RT-PCR SYBR

Компоненты набора	SK032S (100 р-ций)
5X OneTube PCRmix SYBR	600 мкл
OneTube Reverse Transcriptase	100 мкл
Deionized water, nuclease-free	1,5 мл
50X High ROX	55 мкл

В пробирках объемом 0,2 мл готовили конечные реакционные смеси для исследуемых и контрольных образцов. Ревертазу добавляли в последнюю очередь. В процессе проведения ПЦР-РВ с исследуемыми образцами были введены две контрольные реакции для обеспечения валидности полученных данных. Отрицательный контроль без матрицы (NTC) использовался для

мониторинга контаминации реактивов экзогенной ДНК. Отрицательный контроль без обратной транскриптазы (No RT) применялся для выявления возможной контаминации препаратов РНК геномной ДНК.

ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл, содержащие смесь для проведения реакции, центрифугировали на центрифуге с охлаждением SL16R (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 15 с. Затем помещали в блок амплификатора QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-well, 0,2 mL (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ проводили в соответствии с условиями термоциклирования, представленными в таблице 3.

Таблица 3 – Стандартный режим амплификации

Стадия	Температура	Время инкубации	Кол-во циклов	Считывание флуоресценции
Обратная транскрипция	50–55°C	15 мин	1	Нет
Активация полимеразы, инактивация ревертазы	95°C	1 мин	1	Нет
Денатурация	95°C	15 с	50	Нет
Отжиг	T _m (50–68°C)	20 с		Нет
Элонгация и измерение флуоресценции	72°C	20 с		Да
Плавление	от 55 до 95 °C с шагом 0,5 °C	–	1	Да

Для нормализации данных экспрессии был использован ген *GAPDH* в качестве внутреннего контроля. Для обеспечения статистической достоверности каждый анализ проводился в трех биологических повторностях. Для обработки полученных результатов ПЦР использовали метод $\Delta\Delta C_t$ [6].

C_t – количество циклов, необходимое для достижения порогового значения. Пороговый цикл наступает, когда кривая амплификации пересекает линию порога чувствительности прибора в том месте, где график кривой амплификации становится линейным (рисунок 12).

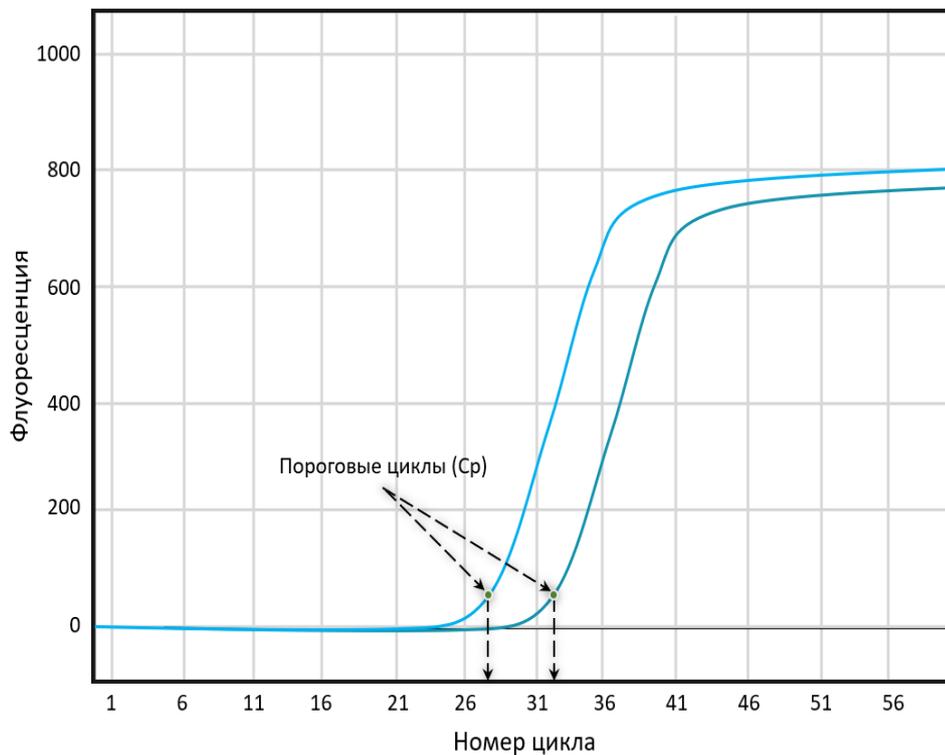


Рисунок 12 – Пример графического определения пороговых циклов

Значение порогового цикла (C_t), являющегося ключевым параметром в ПЦР-РВ, обратно пропорционально начальному количеству мРНК-матрицы в исследуемом образце. Высокие значения C_t указывают на низкое содержание мРНК, поскольку требуется большее количество циклов амплификации для достижения детекции флуоресцентного сигнала, свидетельствующего о накоплении достаточного количества копий кДНК. И напротив, низкие значения C_t коррелируют с высоким уровнем экспрессии гена, отражая значительное содержание мРНК в исходном образце и, соответственно, быстрое достижение порогового значения флуоресценции [6].

Для трех биологических повторностей в каждом экспериментальном условии находили среднее значение C_t . Затем определяли ΔC_t по формуле (6):

$$\Delta C_t = \langle C_t \rangle_{\text{GENE}} - \langle C_t \rangle_{\text{GAPDH}}, \quad (6)$$

где $\langle C_t \rangle_{\text{GENE}}$ – среднее значение величины C_t исследуемого гена по трем биологическим повторностям;

$\langle Ct \rangle_{GAPDH}$ – среднее значение величины Ct референсного гена *GAPDH* сравнения по трем биологическим повторностям.

Затем находили усредненное значение вычисленных ΔCt для контрольных образцов – ΔCt_0 .

Далее находили $\Delta\Delta Ct$ по формуле (7):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_0. \quad (7)$$

Исходное количество матрицы рассчитывали по формуле (8):

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}. \quad (8)$$

При RQ меньше, чем 1, рассчитывали коэффициент кратности изменений FC (Fold change) по формуле (9):

$$FC = \frac{-1}{RQ}. \quad (9)$$

Данные представлены в виде FC по сравнению с контрольными необлученными образцами, значимыми изменениями считали $FC \geq |2|$.

2.6.6 Биоинформатический анализ. Анализ белок-белковых взаимодействий

Для определения белок-белковых взаимодействий (ББВ) был использован ресурс STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [143]. Последовательность поиска взаимодействия в STRING осуществлялась по следующей схеме: выбор организма, для которого нужно искать взаимодействие, а также название белка, UniProt ID или другой идентификатор. Настройка параметров поиска происходила по уровню доверия, источнику данных, параметры отображения сети.

Анализ результатов отображался в виде сети, где узлы представляют белки, а ребра – взаимодействия: розовым цветом отображены экспериментально определенные взаимодействия, а голубым – взаимодействия из баз данных (рисунок 13).

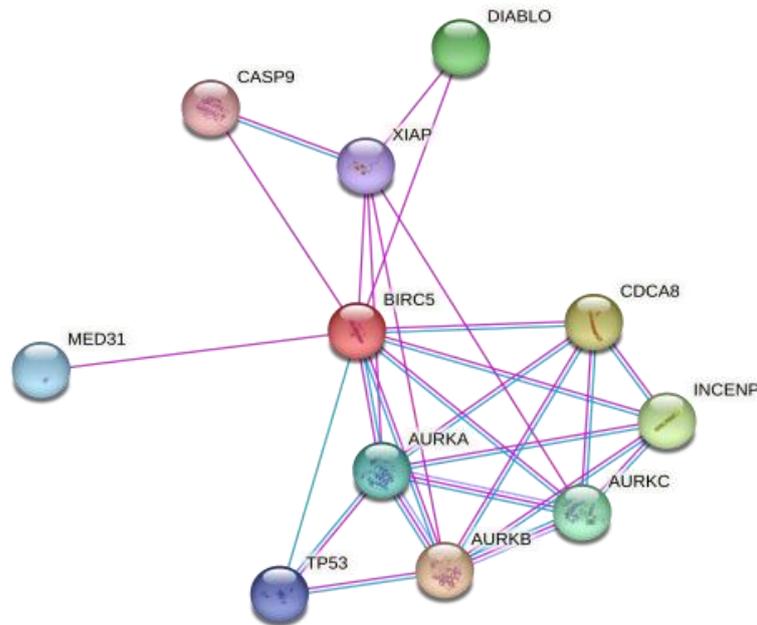


Рисунок 13 – Отображение белок-белковых взаимодействий в базе данных STRING на примере *BIRC5*

Визуализация сети ББВ осуществлялась с помощью Cytoscape (версия 3.10.3), а анализ степени связности узлов проводился с помощью плагина CytoNCA (версия 2.1.6).

Анализ Gene Ontology (GO) был применен для характеристики функциональных ассоциаций генов и прогнозирования их участия в регуляторных сетях. Методология GO предусматривает иерархическую классификацию генов по категориям молекулярных функций, биологических процессов и клеточных компонентов. Анализ обогащения генов, направленный на определение связанных биологических путей, был проведен с использованием Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) посредством программного обеспечения ShinyGO (версия 0.82) Кроме того, для определения функциональной значимости ключевых генов мы использовали clusterProfiler.

2.7 Статистическая обработка данных

Сравнение кривых выживаемости по результатам теста на колониеобразование, оценку метаболической активности по результатам МТТ-теста, оценку пролиферативной активности по результатам времени удвоения проводили с использованием программы Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США), OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Массачусетс, США).

Количественное определение генной экспрессии для каждой исследуемой пробы выполнялось в трех повторах, после чего полученные результаты усреднялись. Расчет относительного уровня экспрессии генов рассчитывался с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittigen, 2001) с нормализацией по экспрессии референсного гена *GAPDH*. Предварительно, перед проведением дальнейших статистических расчетов, нормальность распределения данных была проанализирована с помощью теста Шапиро-Уилка, реализованного в программе Microsoft Excel 2019 (Microsoft, США). Представление итоговых данных выполнено графически в виде медианных значений относительной экспрессии каждого гена. Для визуализации распределения данных были построены диаграммы размаха, отображающие медиану, межквартильный размах (Q1 и Q3) и общий диапазон данных («планки»). Расчет кратного изменения (FC) экспрессии генов был выполнен с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ в программе Microsoft Office Excel 2019 (Microsoft, США). Кратные изменения, превышающие |2|, были признаны значимыми. Корреляционный анализ между экспрессией генов и радиобиологическими эффектами проводился с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена в программе IBM SPSS Statistics 26 (IBM SPSS Statistics Base, США). Корреляцию считали значимой на уровне $p < 0,05$.

Непараметрический критерий Манна-Уитни был использован для выявления статистически значимых расхождений между группой контроля и экспериментальными выборками. Статистически значимыми считались различия при уровне $p < 0,05$. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сравнение чувствительности клеток изучаемых линий к действию ионизирующего излучения и химиопрепарата доксорубицина

3.1.1 Анализ клоногенной активности клеток при действии излучений с различной ЛПЭ

В настоящем разделе представлен анализ радиобиологических эффектов действия γ -излучения (^{60}Co , $E_{\text{ср}} = 1,25$ МэВ), ионов ^{12}C (455 МэВ/ нуклон, ЛПЭ в пике 120–140 кэВ/мкм) и протонов (энергия 100 МэВ) на пять клеточных линий различного гистогенеза: MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HeLa (карцинома шейки матки), HUH-7 (гепатоцеллюлярная карцинома), SK-N-BE(2) (нейробластома) и hTERT (иммортиализованные фибробласты человека).

Первым этапом проведения экспериментального исследования являлось изучение комбинированного действия доксорубицина (концентрация 0,004 мг/мл) и γ -излучения (^{60}Co , $E_{\text{ср}} = 1,25$ МэВ) на клетки различного генеза. Рисунок 14 демонстрирует кривые выживаемости опухолевых клеток в зависимости от дозы облучения, данные для которых были получены в результате клоногенного анализа.

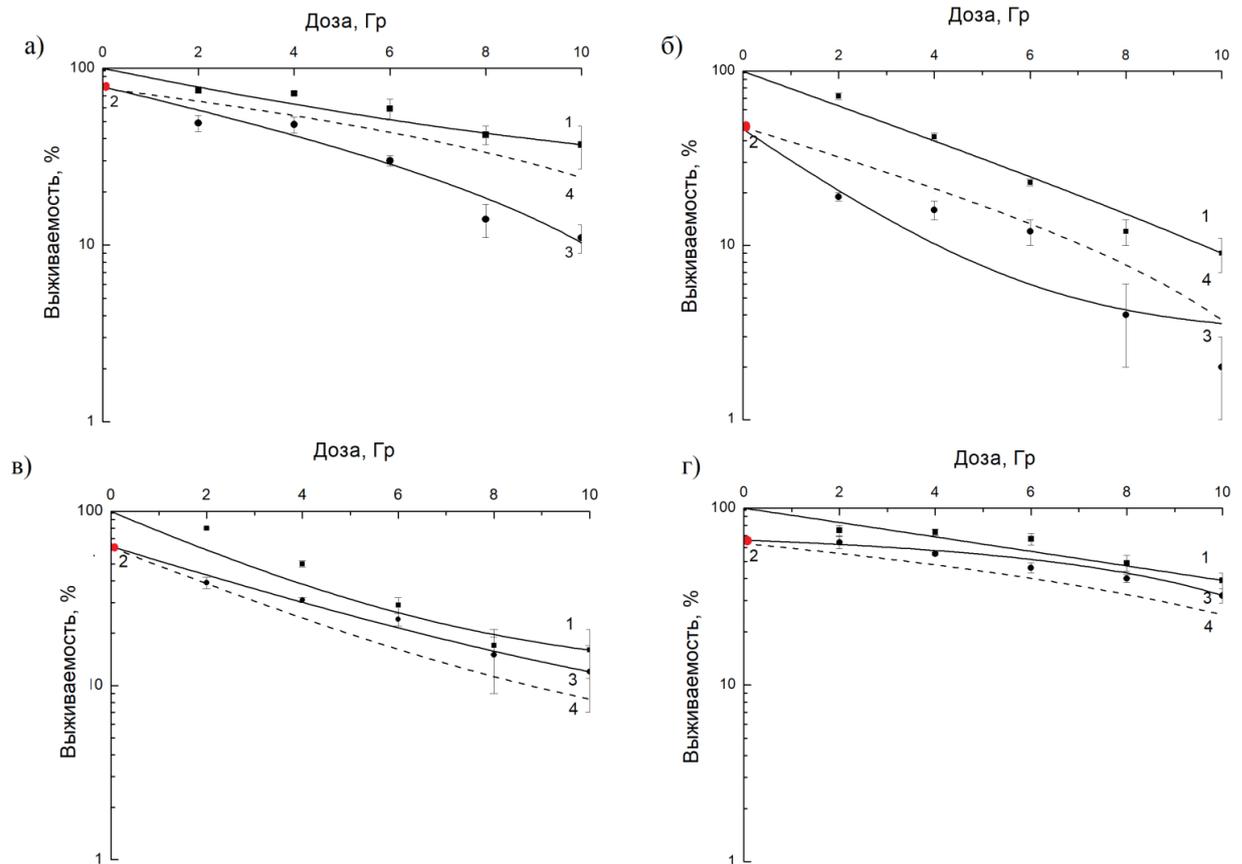


Рисунок 14 – Кривые зависимости выживаемости опухолевых клеток MCF-7 (а), HeLa (б), HUH-7 (в), SK-N-BE(2) (г) от дозы:

- 1 – выживаемость клеток после действия одного ионизирующего излучения,
- 2 – действие доксорубина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата,
- 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и доксорубина. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Согласно результатам проведенного исследования, видно, что доксорубин в концентрации 0,004 мг/мл снижал выживаемость клеток линии MCF-7 на 21% (выживаемость – 79%), HeLa на 52% (выживаемость – 48%), SK-N-BE(2) на 34% (выживаемость – 66%), HUH-7 на 37% (выживаемость – 63%). Наблюдаемая вариабельность в снижении выживаемости клеток указывает на разную чувствительность различных клеточных линий к данному противоопухолевому агенту.

На рисунке 15 графически отображены результаты оценки выживаемости фибробластов линии hTERT.

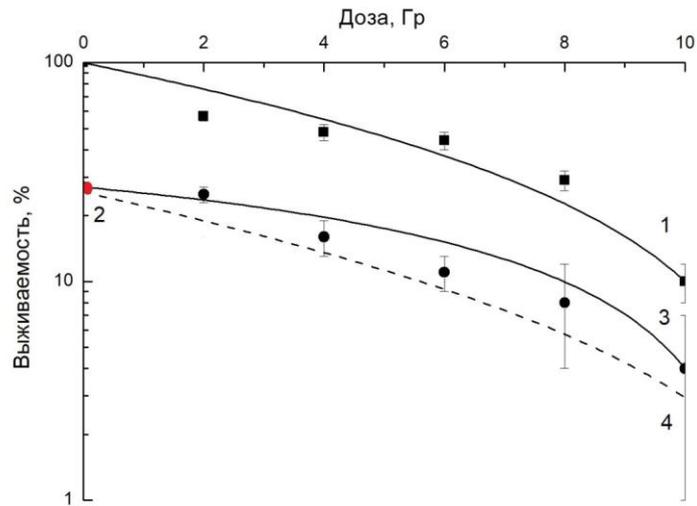


Рисунок 15 – Кривые зависимости выживаемости клеток линии hTERT от дозы:
 1 – выживаемость клеток после действия одного ионизирующего излучения,
 2 – действие доксорубицина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата,
 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и доксорубицина. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Согласно полученным результатам, доксорубин как ингибитор топоизомеразы II, проявляет наиболее выраженную цитотоксичность в отношении клеточной линии hTERT (снижение выживаемости на 73%), что может быть обусловлено несколькими факторами. Высокая экспрессия топоизомеразы II в этих клетках, а также особенности их репарационных механизмов ДНК, могут приводить к усиленному накоплению повреждений ДНК, вызванных доксорубицином, и, как следствие, к более высокому уровню гибели клеток. Менее выраженное действие доксорубицина на клетки MCF-7, HeLa, SK-N-BE(2) и HUH-7 может быть связано с более низкой экспрессией топоизомеразы II, большей эффективностью систем репарации ДНК, или наличием других механизмов защиты от повреждений, индуцированных доксорубицином. Например, различия в экспрессии белков, участвующих в апоптотическом пути, могут влиять на чувствительность к доксорубину.

Проведенный анализ экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что комбинированное действие химиопрепарата и γ -излучения демонстрирует антагонистический характер. Это проявляется в снижении

ожидаемой эффективности повреждения ДНК при их комбинированном применении, что было зафиксировано на культурах клеток гепатокарциномы, нейробластомы и фибробластов. Эмпирические данные, отраженные в экспериментальной кривой, оказались менее выраженными в сравнении с теоретическими предсказанными, что интерпретируется как антагонистический эффект [15].

Анализ текущих результатов указывает на существенное снижение выживаемости клеток: MCF-7 – 11%, HeLa – 9%, hTERT – 4%, SK-N-BE (2) – 32%, HUH-7 – 12%. Степень снижения выживаемости варьирует в зависимости от клеточной линии, указывая на различную чувствительность к комбинированной терапии. Эти различия могут быть обусловлены вариациями в экспрессии генов, участвующих в процессах репарации ДНК, апоптоза, и других механизмах, определяющих ответ на комбинированное действие ионизирующего излучения и доксорубицина.

Так как график не имеет линейной зависимости, по кривым выживаемости клеток был посчитан коэффициент взаимодействия факторов на прямолинейном участке кривой, соответствующей 10% выживаемости согласно формуле 2. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Коэффициент взаимодействия факторов для клеточных линий

Линия клеток	Коэффициент взаимодействия факторов
MCF-7	$1,48 \pm 0,10$
HeLa	$0,97 \pm 0,13$
HUH-7	$0,84 \pm 0,18$
SK-N-BE(2)	$0,84 \pm 0,04$
hTERT	$0,73 \pm 0,01$

Анализ полученных данных выявил, что для клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 коэффициент взаимодействия равен $1,48 \pm 0,10$, тогда как для фибробластов линии hTERT этот показатель составил $0,73 \pm 0,01$. Следовательно, комбинированное действие доксорубицина и γ -излучения носит

синергический характер в отношении клеток линии MCF-7 и антагонистический – для фибробластов линии hTERT. Для клеточной линии HeLa взаимодействие было близким к аддитивному (коэффициент взаимодействия $\approx 1,00$). Комбинированное действие изучаемых агентов на клеточные линии HUH-7 и SK-N-BE(2) демонстрирует выраженное антагонистическое взаимодействие ($0,84 \pm 0,18$ и $0,84 \pm 0,04$ соответственно).

На следующем этапе экспериментальной работы изучалось комбинированное действие доксорубина (концентрация 0,004 мг/мл) и ионов ^{12}C (455 МэВ/нуклон, ЛПЭ в пике 120–140 кэВ/мкм) на опухолевые клеточные линии (рисунок 16).

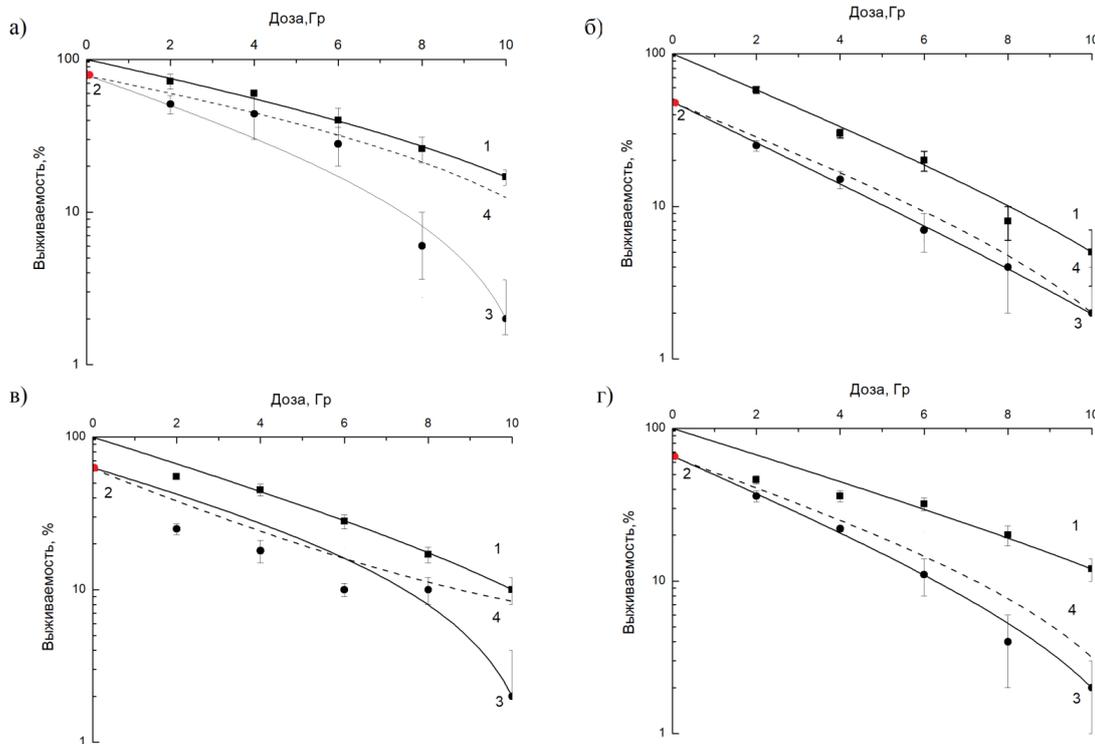


Рисунок 16 – Кривые зависимости выживаемости опухолевых клеток MCF-7 (а), HeLa (б), HUH-7 (в), SK-N-BE(2) (г) от дозы:

1 – выживаемость клеток после действия одного ионизирующего излучения, 2 – действие доксорубина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата, 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и препарата доксорубина. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

На основе представленных данных можно заключить, что в рассматриваемых условиях экспериментально наблюдаемая кривая выживаемости клеток гепатокарциномы, аденокарциномы молочной железы, нейробластомы, а также клеток карциномы шейки матки находится ниже кривой, рассчитанной на основе принципа аддитивности. Уровень клеточной гибели, достигаемый при совместном применении двух агентов, оказался значительно выше того, что ожидалось бы при их индивидуальном действии. Это убедительно подтверждает наличие синергического взаимодействия между ними. При этом минимальная выживаемость клеток наблюдалась при комбинированном действии химиопрепарата и тяжелых заряженных частиц в максимальной дозе для клеток линии MCF-7, HeLa, HUH-7, SK-N-BE(2) и составляет 2%, 2%, 5%, 2% соответственно [11].

Экспериментальные данные о выживаемости фибробластов линии hTERT графически представлены на рисунке 17.

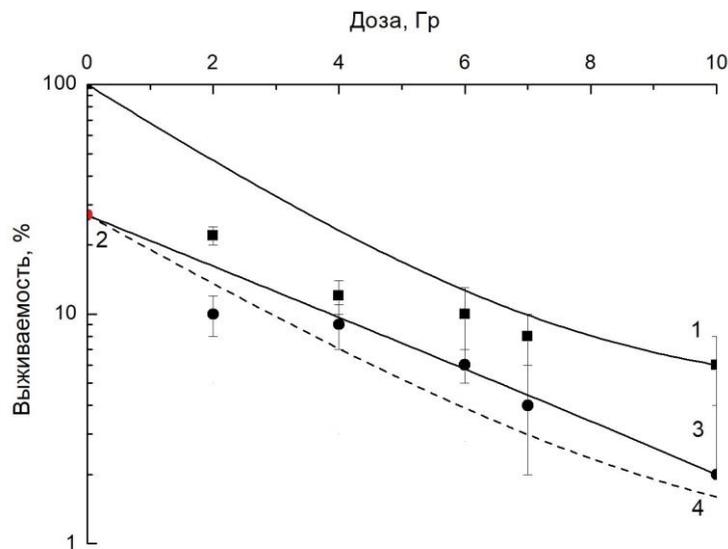


Рисунок 17 – Кривые выживаемости клеток hTERT от дозы:

1 – выживаемость клеток после действия одного ионизирующего излучения, 2 – действие доксорубина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата, 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и препарата доксорубина. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Принимая во внимание полученные данные, можно заключить, что выявлен антагонистический характер взаимодействия между исследуемыми агентами. В свою очередь, при облучении нормальных клеток в максимальной дозе 10 Гр показатель выживаемости составил 6%, а в случае комбинированного действия – 2%.

Коэффициент взаимодействия факторов был рассчитан на прямолинейном участке кривых выживаемости по формуле 2. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Коэффициент взаимодействия факторов для клеточных линий

Линия клеток	Коэффициент взаимодействия факторов
MCF-7	$1,78 \pm 0,06$
HeLa	$1,21 \pm 0,11$
HUH-7	$1,25 \pm 0,09$
SK-N-BE(2)	$1,11 \pm 0,02$
hTERT	$0,65 \pm 0,01$

Анализ данных выявил зависимость характера взаимодействия ионизирующего излучения и доксорубицина от типа клеточной линии и уровня цитотоксического эффекта. Так, для клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 коэффициент взаимодействия составил $1,78 \pm 0,06$, для клеток раковой опухоли шейки матки линии HeLa – $1,21 \pm 0,11$, для клеток гепатоцеллюлярной карциномы линии HUH-7 – $1,25 \pm 0,09$, а для клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) – $1,11 \pm 0,02$. Таким образом, комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C для опухолевых клеток носит синергический характер. Тогда как для клеток линии hTERT характерно антагонистическое взаимодействие ($0,65 \pm 0,01$).

В рамках дальнейшего исследования было проведено изучение комбинированного действия доксорубицина (концентрация 0,004 мг/мл) и протонов (энергия 100 МэВ) на опухолевых клетках (рисунок 18).

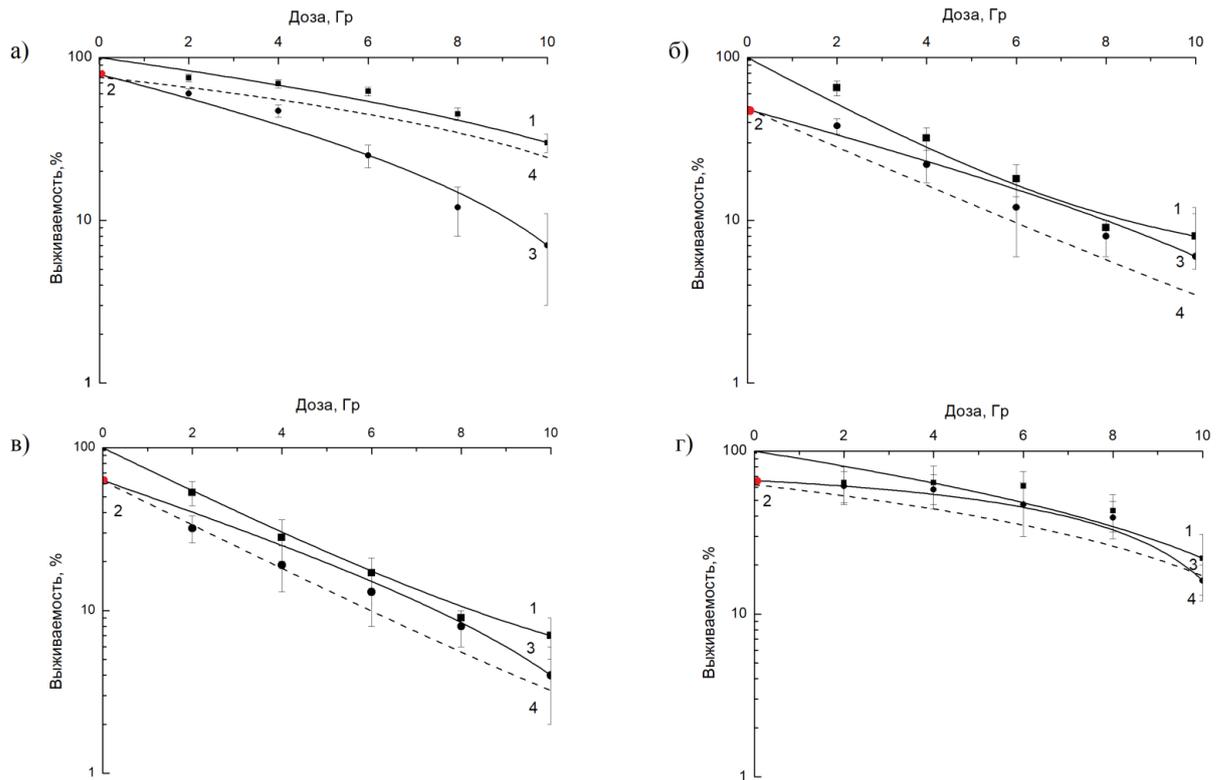


Рисунок 18 – Кривые зависимости выживаемости опухолевых клеток MCF-7 (а), HeLa (б), HUH-7 (в), SK-N-BE(2) (г) от дозы:

1 – выживаемость клеток после действия одного ионизирующего излучения, 2 – действие доксорубина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата, 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и препарата доксорубина. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Полученные сведения демонстрируют, что комбинированное действие двух агентов индуцирует существенно более выраженную цитотоксичность в отношении клеток аденокарциномы молочной железы. Этот результат значительно превышает ожидаемый эффект от их аддитивного действия при раздельном использовании излучения и антибиотика антрациклинового ряда, что убедительно подтверждает синергическое взаимодействие. Тем не менее, для клеток гепатокарциномы линии HUH-7, клеток карциномы шейки матки линии HeLa, клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) было установлено, что взаимодействие между этими же факторами носит антагонистический характер [11].

Результаты экспериментального исследования выживаемости нормальных клеток фибробластов отражены на рисунке 19.

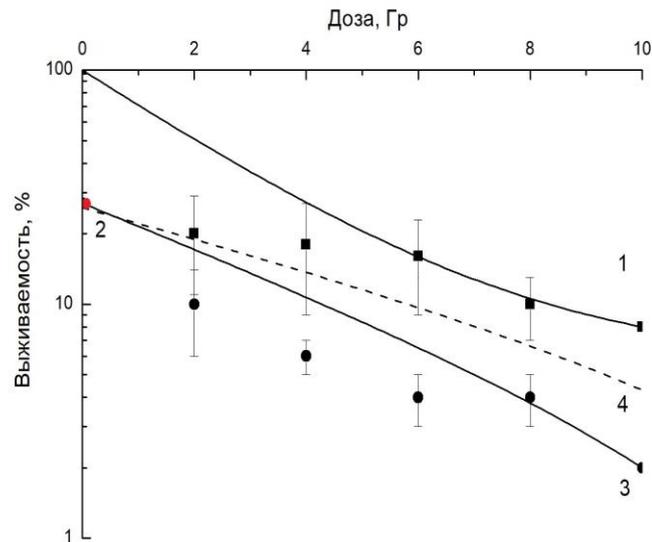


Рисунок 19 – Кривые выживаемости клеток hTERT от дозы:

- 1 – выживаемость клеток после действия одного ионизирующего излучения,
 2 – действие доксорубицина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата,
 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и препарата доксорубицина. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Полученные данные, демонстрируют, что комбинированное действие рассматриваемых факторов на фибробласты линии hTERT носит синергический характер, что подтверждается снижением выживаемости клеток ниже уровня, предсказанного аддитивной моделью.

На основании ранее изложенных результатов, необходимо отметить, что при комбинированном действии доксорубицина и пучка протонов наблюдается выраженное подавление жизнеспособности всех рассматриваемых клеточных линий. При воздействии максимальной дозы радиации каждая из исследованных клеточных линий продемонстрировала минимальные показатели выживаемости. Так, выживаемость для клеток гепатокарциномы линии HUH-7 составила 4%, для клеток карциномы шейки матки линии HeLa и аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 показатели выживаемости составили 7%, клетки нейробластомы

линии SK-N-BE(2) сохранили 16% жизнеспособности, а фибробласты линии hTERT оказались наиболее чувствительными, выживаемость которых составила 2%.

Так как график не имеет линейной зависимости, по кривым выживаемости клеток после облучения был посчитан коэффициент взаимодействия факторов. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Коэффициент взаимодействия факторов для клеточных линий

Линия клеток	Коэффициент взаимодействия факторов
MCF-7	$1,57 \pm 0,03$
HUH-7	$0,89 \pm 0,12$
HeLa	$0,71 \pm 0,01$
SK-N-BE(2)	$0,98 \pm 0,02$
hTERT	$1,10 \pm 0,02$

Полученные результаты указывают на преобладание антагонистического эффекта. Значение коэффициента взаимодействия для клеток гепатоцеллюлярной карциномы линии HUH-7 составило $0,89 \pm 0,12$, для клеток карциномы шейки матки линии HeLa – $0,71 \pm 0,01$, для клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) – $0,98 \pm 0,02$. В свою очередь, комбинированное действие доксорубицина и протонов для аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 (коэффициент взаимодействия – $1,57 \pm 0,03$) и фибробластов линии hTERT (коэффициент взаимодействия – $1,10 \pm 0,02$) носит синергический характер.

Таким образом, исследование выявило гетерогенность взаимодействия доксорубицина с различными типами ионизирующего излучения в зависимости от клеточной линии. Использование излучения с высокой ЛПЭ (ионы ^{12}C) продемонстрировало более выраженный синергический эффект, особенно в линии MCF-7, по сравнению с излучением низкой ЛПЭ (γ -излучение), а также протонами: $1,78 \pm 0,06$ против $1,48 \pm 0,10$ и $1,57 \pm 0,03$ соответственно. Наиболее радиорезистентная клеточная линия SK-N-BE(2) продемонстрировала эффект, близкий к аддитивному при действии протонов ($0,98 \pm 0,02$) и γ -излучения ($0,84 \pm$

0,04), в то время как при действии ^{12}C наблюдалось синергическое взаимодействие ($1,11 \pm 0,02$). Клетки линии HeLa и HUH-7 демонстрировали антагонизм при воздействии протонов ($0,71 \pm 0,01$ и $0,89 \pm 0,12$ соответственно) и γ -излучения ($0,97 \pm 0,13$ и $0,84 \pm 0,18$), но синергизм при воздействии ионов ^{12}C ($1,21 \pm 0,11$ и $1,25 \pm 0,11$ соответственно). Нормальные клетки линии hTERT демонстрировали проявление выраженного синергизма в группе с действием протонного излучения ($1,10 \pm 0,02$). Однако антагонизм наблюдался и при действии γ -излучения ($0,73 \pm 0,01$) и ионов ^{12}C ($0,65 \pm 0,01$).

Представляется вероятным, что наблюдаемые различия в эффективности комбинированной терапии обусловлены различиями в характере повреждений ДНК, индуцируемых излучением с различной ЛПЭ. Воздействие ионов ^{12}C , представляющих собой высокоэнергетическое излучение, индуцирует образование кластеров повреждений в структуре ДНК. Данные кластеры характеризуются высокой плотностью повреждений, локализованных на небольшом фрагменте молекулы ДНК. Доксорубин, выступая в роли ингибитора топоизомеразы II, способствует возникновению в ДНК повреждений, качественно отличных от тех, что вызываются ионизирующим излучением. Вероятной причиной синергического эффекта, наблюдаемого при действии корпускулярного излучения, является нелинейное возрастание количества повреждений ДНК, которые превосходят потенциал клеточных репарационных механизмов. В отличие от этого, при воздействии излучения с низкой ЛПЭ, повышенная эффективность процессов репарации ДНК может обуславливать снижение синергического взаимодействия или даже его переход в антагонистическое.

3.1.2 Анализ ОБЭ излучений с различной ЛПЭ

Следующий этап исследования был посвящен количественной оценке относительной биологической эффективности различных типов ионизирующего излучения.

Исходя из полученных данных, представленных на рисунках 14–19, выживаемость клеток MCF-7 при облучении в дозе 10 Гр составила 17% (воздействие ионов ^{12}C), 29% (воздействие протонов) и 37% (воздействие γ -излучения). Установлено, что протоны оказывают наиболее выраженное цитотоксическое действие на клетки HeLa, приводя к 18% выживаемости, тогда как выживаемость при воздействии ионов ^{12}C и γ -излучения составила 5% и 23% соответственно. Результаты исследований показали, что наиболее выраженное ингибирование выживаемости клеток нейробластомы наблюдается при воздействии ионов ^{12}C , где этот показатель достигает 5%. Для сравнения, после воздействия протонов жизнеспособность этих клеток составила 22%, а после γ -излучения – 39%. При анализе жизнеспособности клеток гепатокарциномы после облучения дозой 10 Гр, были получены следующие показатели: 7% при воздействии ионов ^{12}C , 14% при воздействии γ -излучения и 10% при протонном облучении. Наиболее значительное ингибирование пролиферации наблюдали на клетках линии hTERT: при облучении в дозе 10 Гр выживаемость составила 6% при воздействии ионов ^{12}C , 10% при воздействии протонов и 17% при воздействии γ -излучения. Результаты демонстрируют существенные различия в радиочувствительности исследованных клеточных линий к различным видам ионизирующего излучения.

На основе полученных кривых выживаемости клеток, с применением формулы (1), была рассчитана ОБЭ различных типов излучения. Результаты расчёта ОБЭ представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Показатель ОБЭ при действии корпускулярного излучения

Линия клеток	Показатель ОБЭ	
	^{12}C	Протоны
MCF-7	2,07 ±0,07	1,59±0,09
HUH-7	1,50 ±0,05	1,23±0,03
HeLa	1,81±0,13	1,01±0,05
SK-N-BE(2)	2,75±0,01	1,27±0,06
hTERT	2,90±0,12	2,56 ±0,49

Результаты расчета ОБЭ ионов ^{12}C и протонов для клеточных линий MCF-7, HeLa, HUH-7, SK-N-BE(2) и hTERT демонстрируют вариабельность ответа, связанную с типом излучения и особенностями клеток.

Высокая ОБЭ ионов ^{12}C для MCF-7, SK-N-BE(2), и особенно hTERT, согласуется с литературными данными, указывающими на повышенную эффективность излучения с высокой ЛПЭ в индукции тяжёлых повреждений ДНК, таких как двухцепочечные разрывы, труднее поддающиеся репарации. Более низкие значения ОБЭ для клеточной линии HUH-7 (при действии ионов ^{12}C) может быть следствием более эффективной системы репарации двухцепочечных разрывов или других механизмов защиты от радиационного повреждения, специфичных для данной клеточной линии. Значительное увеличение ОБЭ для hTERT при 37% может быть связано с гетерогенностью клеточной популяции, где подпопуляция клеток с особенностями, делающими их крайне чувствительными к ионизирующему излучению, в большей степени проявляется при более низком уровне выживаемости. ОБЭ протонов (более низкая ЛПЭ, чем у ионов углерода) ниже, что согласуется с общими представлениями о зависимости ОБЭ от ЛПЭ [114]. Однако высокая ОБЭ для hTERT и здесь подтверждает выраженную радиочувствительность этой клеточной линии, возможно, связанную с особенностями регуляции клеточного цикла.

В клинической практике для расчета дозы протонной терапии применяется среднее значение ОБЭ $\approx 1,1$ по всей области распространения дозы пика Брэгга. Данное обобщенное значение получено на основании результатов исследований

in vivo и *in vitro*, проведенных в начальный период применения протонной терапии [72, 152, 153, 154]. Экспериментальные данные по определению ОБЭ в различных областях распределенного пика Брэгга (spread-out Bragg peak – SOBPR) преимущественно получены с применением технологий пассивного рассеивания. Информация, полученная при использовании узкофокусированных сканирующих пучков, ограничена.

Большая часть ранних исследований была направлена на определение относительной биологической эффективности в центральной части SOBPR. Значения ОБЭ, полученные в *in vitro* исследованиях, варьировали от 0,86 до 2,1 (среднее значение 1,22), а в *in vivo* исследованиях – от 0,73 до 1,55 (среднее значение 1,1) [119].

Исследование с использованием клеточной линии рака слюнной железы человека HSG, продемонстрировало усиление радиобиологического эффекта клинических протонных пучков в распределенном пике Брэгга *in vitro* [107]. Экспериментально показано, что выживаемость клеток HSG после облучения протонными пучками с энергией 190 МэВ/нуклон существенно снижается в зависимости от глубины проникновения пучка в дистальной области SOBPR. Анализ колониеобразования показал относительную биологическую эффективность в отношении 10% и 60% уровней выживаемости клеток. В центре SOBPR значения ОБЭ₁₀ и ОБЭ₆₀ составили 1,24 и 1,20 соответственно. Наблюдалось достоверное увеличение ОБЭ с глубиной проникновения, достигая максимального значения 1,86 на глубине 180 мм Н₂О. Полученные результаты свидетельствуют о повышении цитотоксичности протонного излучения на дистальном конце SOBPR по сравнению с центральной областью, приблизительно на 50% [107].

Важно отметить, что значения ОБЭ, определяемые экспериментально, зачастую демонстрируют значимое и систематическое отклонение от рекомендованного значения 1,1 Международной комиссией по радиационным единицам и измерениям. Так, в работе, выполненной на установке IVA Proteus 230 центра протонной терапии в Праге на нормальных фибробластах дермы

новорожденных (CC-2509 - Lonza), продемонстрировано, что в дистальной области расширенного пика Брэгга ОБЭ составила $2,05 \pm 0,44$, $1,85 \pm 0,42$ и $1,53 \pm 0,38$ для уровней выживаемости клеток 90%, 50% и 10% соответственно [109].

Полученные значения ОБЭ, в ходе нашего исследования, демонстрируют сопоставимость с результатами других работ: наблюдается соответствие значений $2,07 \pm 0,07$ и $1,59 \pm 0,09$ (MCF-7), $1,50 \pm 0,05$ и $1,23 \pm 0,03$ (HeLa), $2,90 \pm 0,12$ и $2,56 \pm 0,49$ (hTERT), $1,81 \pm 0,13$ и $1,01 \pm 0,05$ (HUN-7), и $2,75 \pm 0,01$ и $1,27 \pm 0,06$ (SK-N-BE(2)) для ионов ^{12}C и протонов соответственно. Это соответствие наблюдается несмотря на различия в использованных энергиях протонов и клеточных линиях. Тем не менее, полученные значения отличаются от общепринятого значения ОБЭ, равного 1,1. Повышенная ОБЭ, вероятно, обусловлена высокой плотностью ионизации в области пика Брэгга [3]. В научной литературе имеются данные, подтверждающие повышение ОБЭ для протонного излучения (ЛПЭ 3–8 кэВ/мкм) до 1,5 при 10% выживаемости клеток. Высокая ОБЭ ионов углерода ($4,1 \pm 0,4$ при 10% выживаемости) на клетках меланомы V16F10 подтверждает сильную зависимость ОБЭ от ЛПЭ [3].

Сравнение с результатами собственного исследования демонстрирует сопоставимость значений ОБЭ для различных клеточных линий (MCF-7, HeLa, HUN-7, SK-N-BE(2), hTERT), подтверждая зависимость ОБЭ от типа клеток и условий облучения, а также подтверждая тенденцию к увеличению ОБЭ с повышением ЛПЭ.

Несмотря на обширные исследования, вопрос о величине ОБЭ протонного излучения остается дискуссионным. Данные настоящего исследования, а также результаты ряда независимых *in vitro* экспериментов, выполненных на различных ускорителях в разных странах, свидетельствуют о систематическом превышении экспериментально определённых значений ОБЭ над рекомендованным ICRU значением 1,1. Согласно большинству опубликованных данных, ОБЭ возрастает с глубиной проникновения в пике Брэгга вследствие увеличения ЛПЭ, достигая максимального значения в дистальной части пика [105, 107].

3.2 Оценка пролиферативной активности клеточных популяций

Определение времени удвоения клеток, базирующееся на кинетике роста популяции за заданный период, представляет собой интегральный параметр, отражающий совокупное влияние эффективности репарации ДНК, скорости прохождения клеточного цикла и присутствия факторов, влияющих на пролиферацию. Сокращение времени удвоения может коррелировать с высокой эффективностью репарации и ускоренным клеточным делением, тогда как его увеличение может свидетельствовать о нарушении репарационных механизмов, замедлении митоза или ингибировании роста. Оценка времени удвоения клеточной популяции была выполнена для сравнительного анализа пролиферативной активности необлученных клеток и клеточных линий.

Данные, представленные на рисунке 20, отражают количественный анализ динамики времени удвоения популяций опухолевых клеток после действия химиопрепарата доксорубицина и γ -излучения (^{60}Co , $E_{\text{cp}} = 1,25 \text{ МэВ}$).

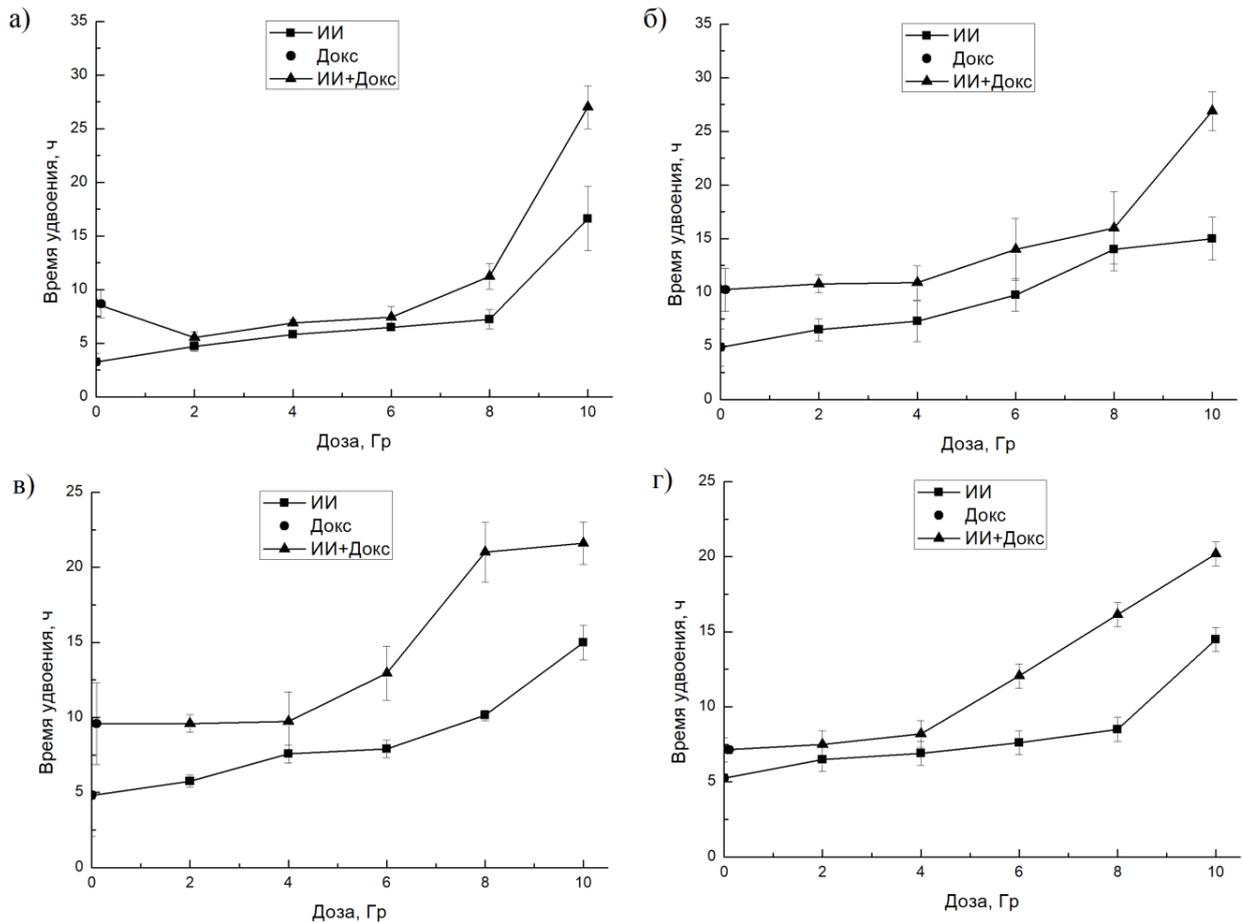


Рисунок 20 – Показатели времени удвоения опухолевых клеток: MCF-7 (а), HeLa (б), HUH-7 (в), SK-N-BE(2) (г). Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Продемонстрировано, что время, за которое популяция клеток увеличится вдвое без воздействия химических и физических факторов, составляет \square 3 ч для клеток линии MCF-7, для клеток HeLa, HUH-7 и SK-N-BE(2) этот показатель составлял \square 4–5 ч. При облучении в максимальной дозе 10 Гр время удвоения опухолевых клеток увеличилось до 15–17 ч, тогда как при комбинированном действии этот показатель составил 20–27 ч.

Воздействие доксорубина приводило к увеличению времени удвоения до 7 – 9,5 ч: для клеток линий HeLa и HUH-7 – 9,5 ч, для клеток линии MCF-7 – 8 ч, для клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) – 7 ч.

Рисунок 21 иллюстрирует влияние химиопрепарата доксорубина и γ -излучения на кинетику пролиферации клеток hTERT.

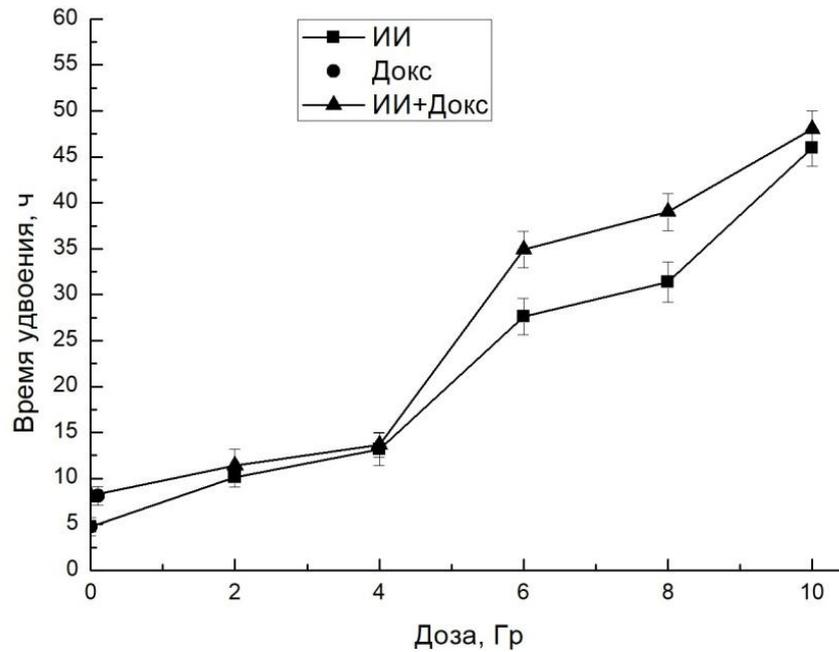


Рисунок 21 – Показатели времени удвоения клеток линии hTERT. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Показано, что время удвоения фибробластов в контрольной группе составляет ~ 4 ч, в то время как при комбинированном действии данный показатель увеличивается до 48 ч, что может указывать на значительное ингибирование пролиферативной активности.

Анализ пролиферативной активности клеточных линий MCF-7, HeLa, SK-N-BE(2), HUH-7 был выполнен после воздействия доксорубицина и протонов как в комбинированном, так и в отдельном режимах. Результаты, полученные в ходе проведения анализа, визуализированы на рисунке 22.

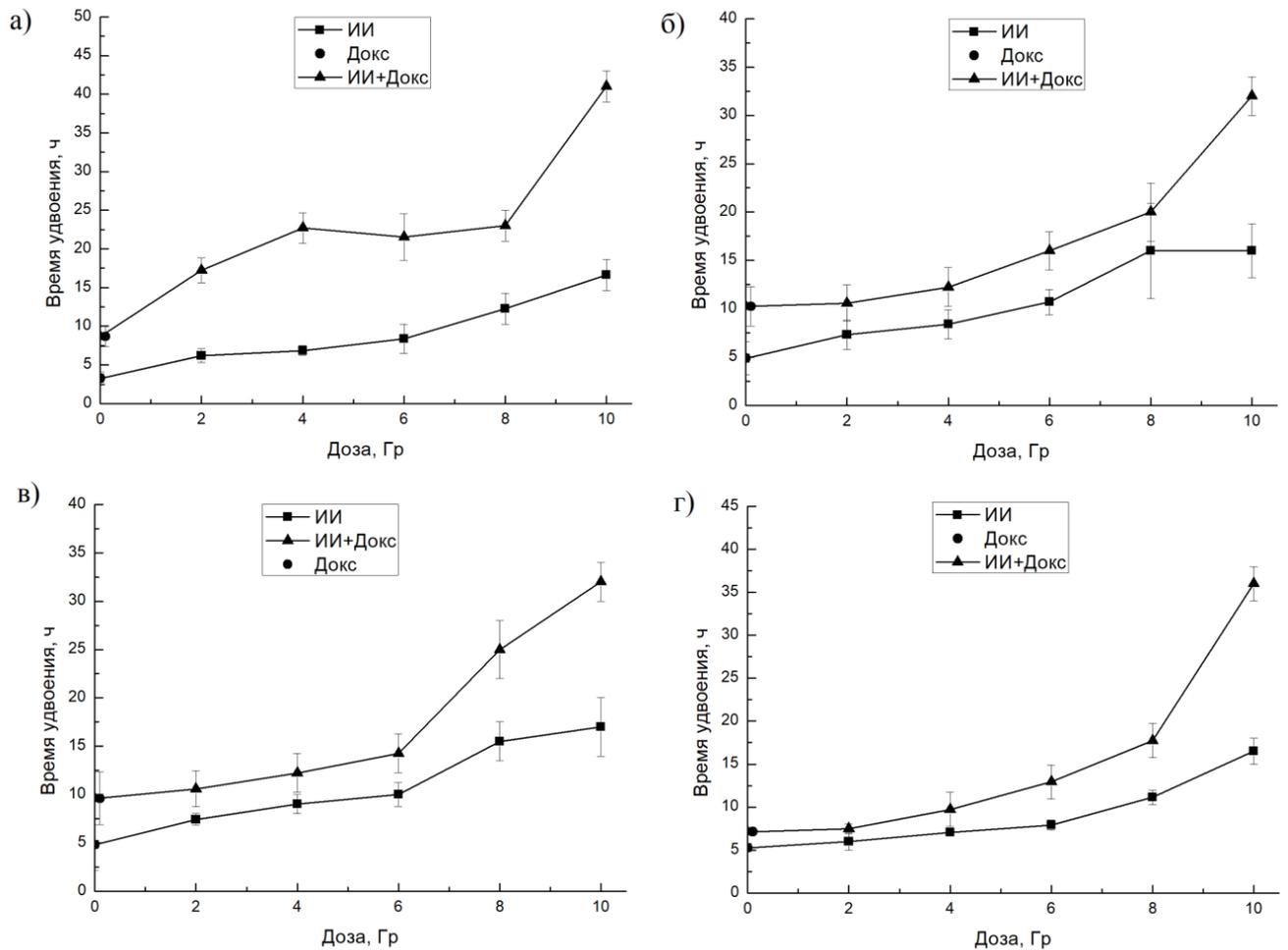


Рисунок 22 – Показатели времени удвоения опухолевых клеток: MCF-7 (а), HeLa (б), HUH-7 (в), SK-N-BE(2) (г). Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Результаты исследования демонстрируют, что время удвоения клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 после комбинированного действия доксорубицина и протонного излучения составило 41 ч. Увеличению времени удвоения наблюдалось для клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2), где данный показатель достиг 36 ч. Установлено, что для клеток линий HeLa и HUH-7 при облучении в дозе 10 Гр, время удвоения клеточной популяции составило 32 ч.

На рисунке 23 представлены результаты времени удвоения нормальных клеток hTERT.

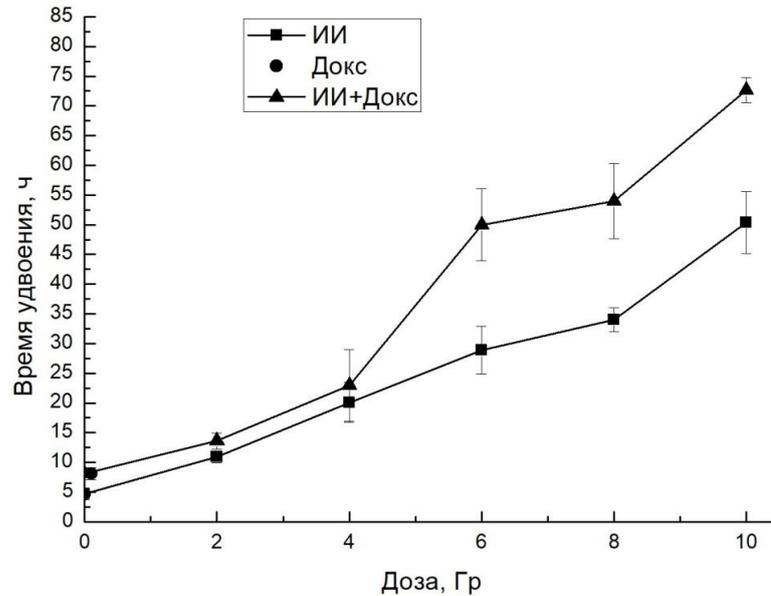


Рисунок 23 – Показатели времени удвоения клеток линии hTERT. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Исходя из представленных данных, у фибробластов линии hTERT наблюдается наибольшее увеличение времени удвоения (с 5 до 73 ч), что указывает на их высокую чувствительность к повреждению ДНК, индуцированному ионизирующим излучением. Высокий показатель задержки клеточного деления может свидетельствовать практически о полной гибели клеток при облучении в дозе 10 Гр, что указывает на критический уровень повреждения ДНК, превышающий возможности клеточных механизмов репарации и приводящий к остановке клеточного цикла и гибели клеток.

На следующем этапе представлен анализ времени удвоения клеток, характеризующий скорость пролиферации клеток как после комбинированного, так и после отдельного действия доксорубицина и ионов ^{12}C (455 МэВ/нуклон, ЛПЭ в пике 120–140 кэВ/мкм). Рисунок 24 иллюстрирует полученные значения времени удвоения для исследуемых опухолевых клеток.

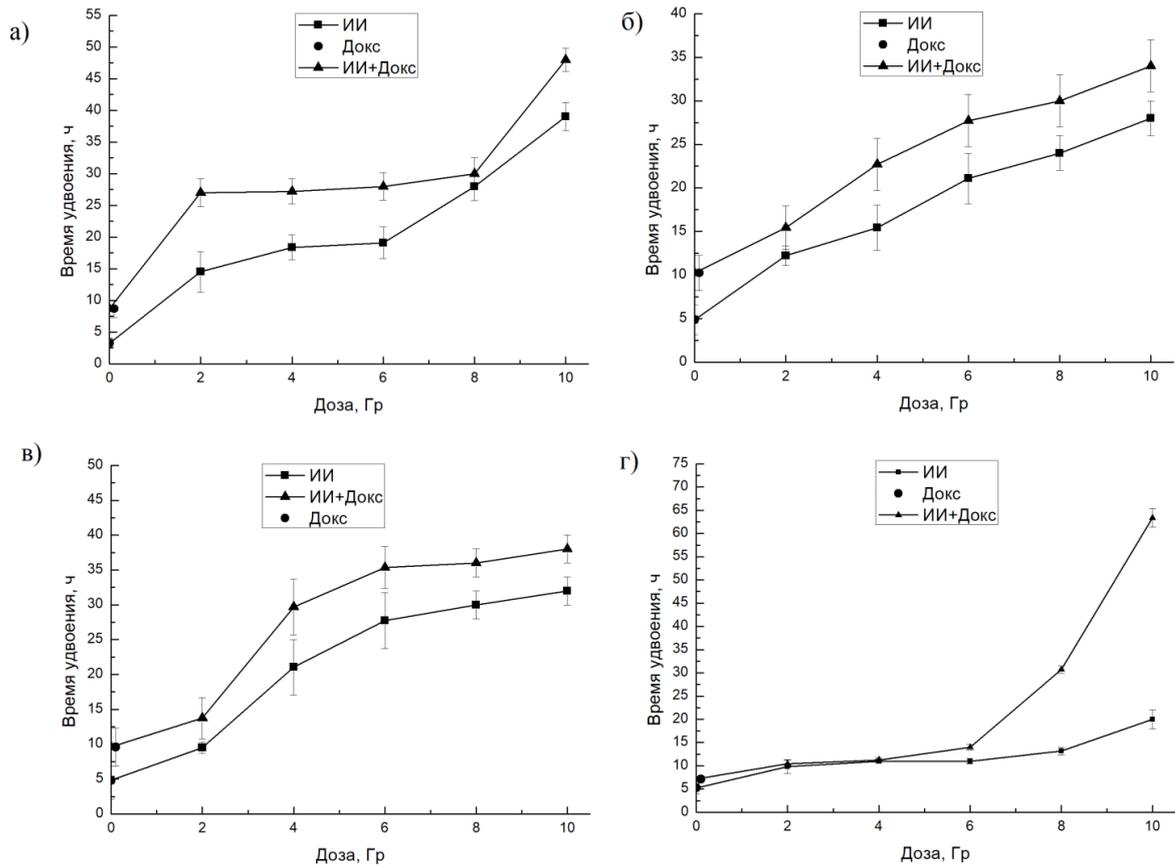


Рисунок 24 – Показатели времени удвоения опухолевых клеток: MCF-7 (а), HeLa (б), HUH-7 (в), SK-N-BE(2) (г). Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

На основании комплексного анализа полученных результатов продемонстрировано, что комбинированное действие доксорубина и ионов ^{12}C приводило к наиболее выраженной задержке клеточного цикла. Максимальная продолжительность клеточного цикла составила 48 ч для клеток MCF-7 (при комбинированном действии доксорубина и γ -излучения – 27 ч, при комбинированном действии доксорубина и протонов – 41 ч), для клеток SK-N-BE(2) – 63 ч (при комбинированном действии доксорубина и γ -излучения – 20 ч, при комбинированном действии доксорубина и протонов – 36 ч), для клеток HUH-7 – 38 ч (при комбинированном действии доксорубина и γ -излучения – 22 ч, при комбинированном действии доксорубина и протонов – 32 ч), для клеток HeLa – 34 ч (при комбинированном действии доксорубина и γ -излучения – 27 ч, при комбинированном действии доксорубина и протонов – 32 ч).

На рисунке 25 представлен анализ кинетики пролиферации клеточной линии hTERT.

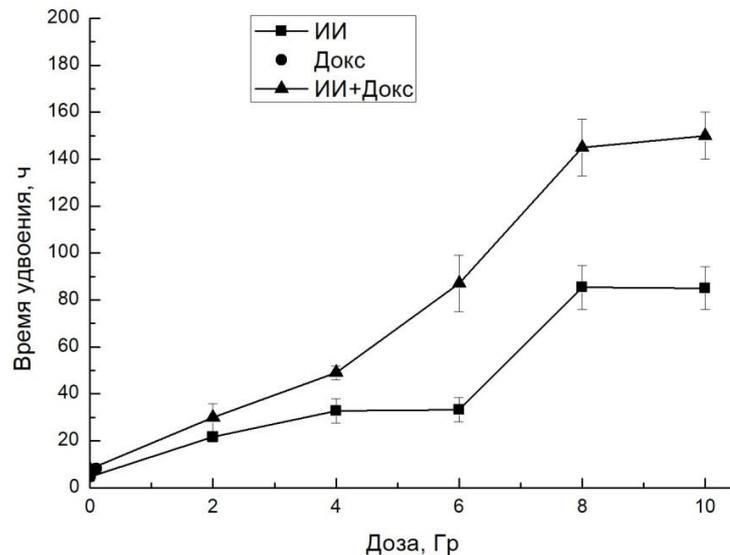


Рисунок 25 – Показатели времени удвоения клеток линии hTERT. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Согласно представленным данным, время удвоения для контрольной группы нормальных клеток фибробластов линии hTERT составляет \square 5 ч. Комбинированное действие увеличило время удвоения до 150 ч, в то время как γ -излучение – до 48 ч, а воздействие протонов в дозе 10 Гр приводило к увеличению времени удвоения до 73 ч.

Таким образом, полученные данные в ходе проведенного анализа свидетельствуют о существенном влиянии ионизирующего излучения и доксорубицина на пролиферативную активность исследованных клеточных линий. Более короткое время удвоения клеток MCF-7 по сравнению с HeLa, HUN-7 и SK-N-BE(2) в контрольных условиях указывает на их более высокую скорость пролиферации.

Значительное увеличение времени удвоения при облучении в дозе 10 Гр как в случае комбинированного действия, так и при действии только ионизирующего излучения, объясняется повреждением ДНК, активацией контрольных точек клеточного цикла (G1/S, G2/M) и, как следствие, замедлением или остановкой

клеточного деления. Зависимость доли клеток в фазе G2/M клеточного цикла от времени после воздействия и типа клеточной линии была продемонстрирована в исследовании радиочувствительности, где четыре клеточные линии подвергались облучению рентгеновскими лучами и ионами ^{12}C в диапазоне доз от 2 до 12 Гр [102]. Авторы предполагают, что это может служить маркером увеличения устойчивости к ионизирующему излучению.

Более выраженное увеличение времени удвоения при комбинированном действии по сравнению с монотерапией ионизирующим излучением может быть связано с синергическим эффектом двух агентов, усиливающих повреждение ДНК и вызывающих более значительный ответ со стороны механизмов контроля клеточного цикла. Четырехкратное превышение времени удвоения при облучении в дозе 2 Гр в группе с комбинированным действием по сравнению с группой с монотерапией ионизирующим излучением указывает на высокую чувствительность клеток к комбинированному лечению на начальных этапах воздействия, что, вероятно, обусловлено неполным восстановлением повреждений ДНК. Уменьшение этой разницы с увеличением дозы может объясняться насыщением механизмов репарации ДНК или превалированием повреждений, вызванных ионизирующим излучением, над эффектами доксорубина. Воздействие доксорубина, ингибитора топоизомеразы II, также приводит к замедлению клеточного цикла путем индукции повреждений ДНК, что подтверждается увеличением времени удвоения.

3.3 Анализ метаболической активности клеток

В рамках данного этапа исследования проводилась оценка метаболической активности опухолевых и нормальных клеток с помощью МТТ-теста. На рисунке 26 для клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 представлены графики QQ-plot, отражающие показатели оптической плотности в зависимости от факторов воздействия.

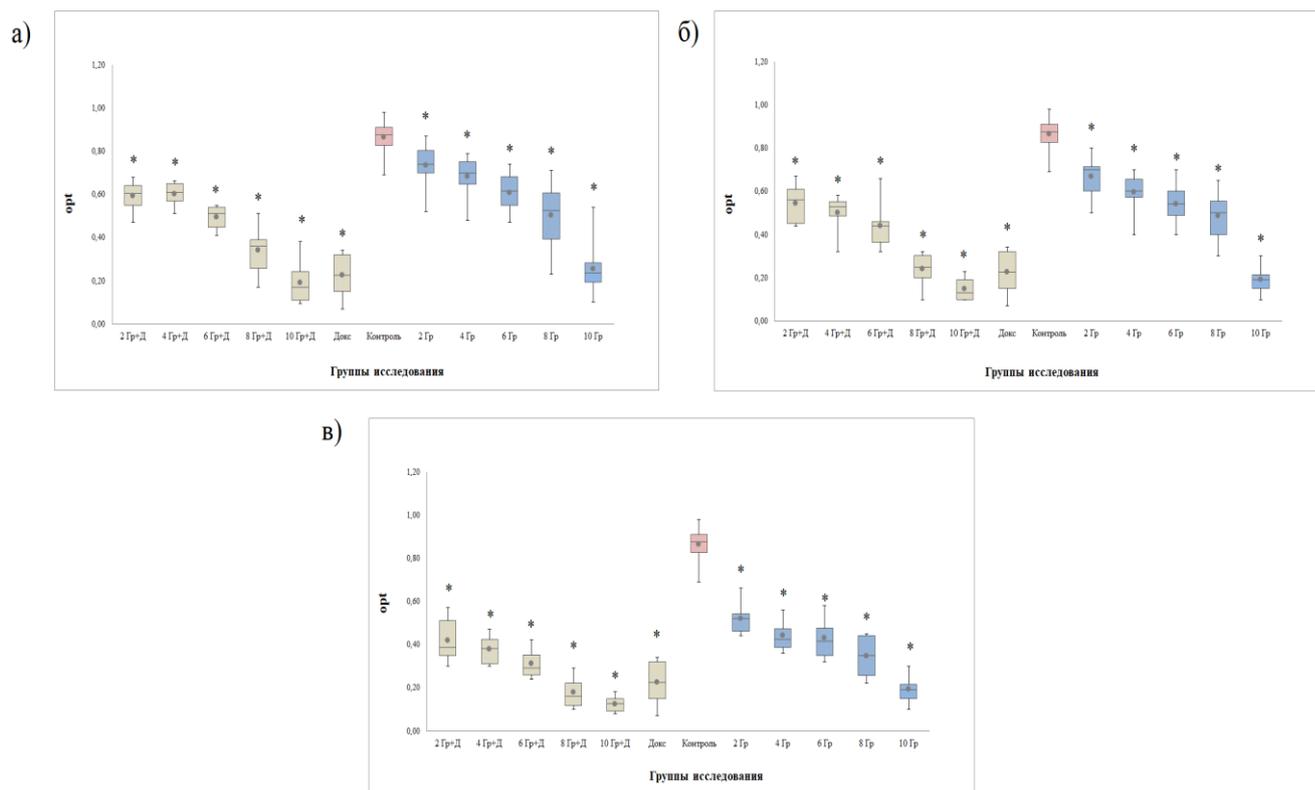


Рисунок 26 – Сравнение оптической плотности клеток линии MCF-7:
 а) – γ -излучение; б) – протоны; в) – ионы ^{12}C
 (* – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$)

Выявлено дозозависимое ингибирование пролиферации клеток MCF-7 в случае комбинированного действия доксорубицина и ионизирующего излучения, выраженное снижением оптической плотности (opt) по сравнению с контрольной группой (показатель оптической плотности составил 0,86). Ионы ^{12}C проявляют наиболее выраженную цитотоксичность, снижая оптическую плотность до 0,18 при облучении в дозе 10 Гр, что может быть обусловлено образованием кластеров повреждений ДНК, не поддающихся эффективной репарации. Протоны также демонстрируют значительное ингибирование пролиферации при облучении в дозе 10 Гр (0,19), превосходящее эффект γ -излучения (0,25).

Предполагается, что синергическое усиление цитотоксического эффекта, наблюдаемое при комбинированном действии, обусловлено аддитивным повреждением ДНК, вызванным ингибированием активности топоизомеразы II доксорубицином и радиационно-индуцированными повреждениями. В свою

очередь, действие доксорубина также характеризуется выраженной цитотоксичностью (показатель оптической плотности составил 0,34).

Далее рисунок 27 иллюстрирует результаты анализа метаболической активности для клеточной линии hTERT.

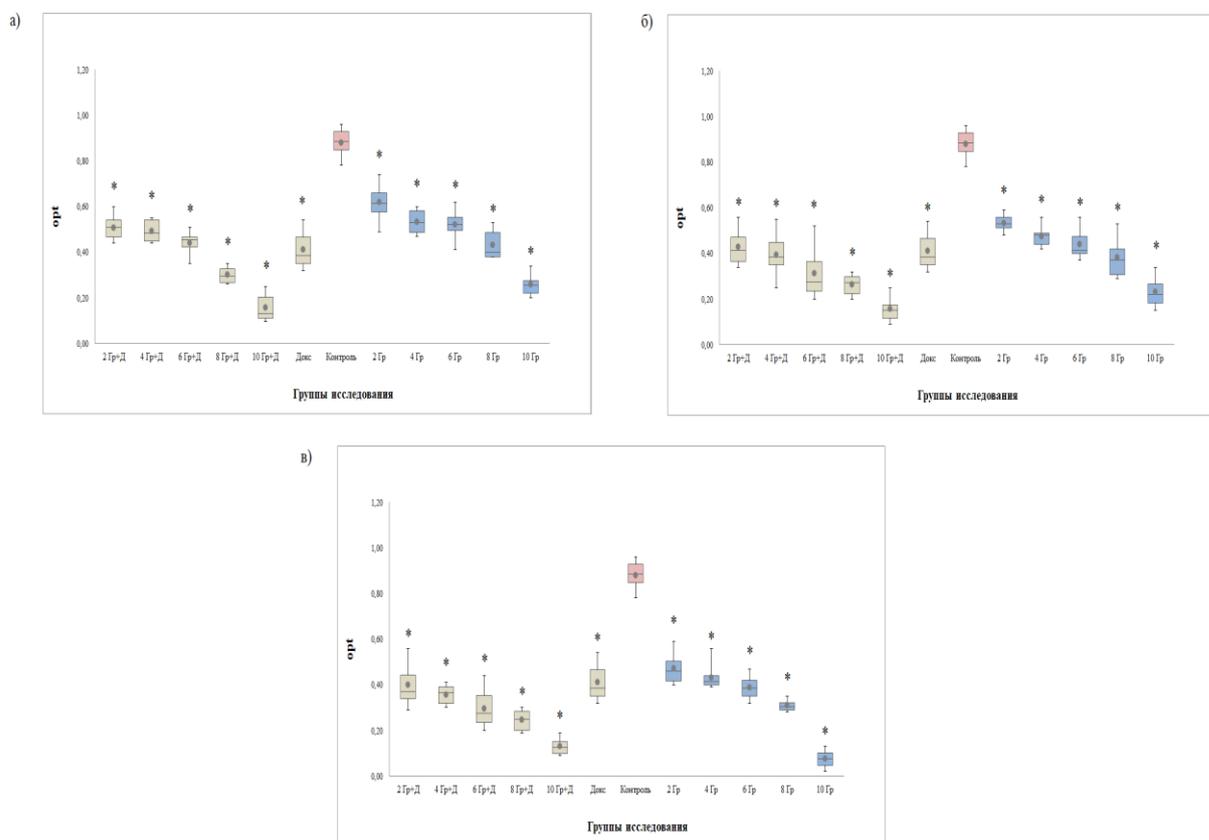


Рисунок 27 – Сравнение оптической плотности клеток линии hTERT:
 а) – γ -излучение; б) – протоны; в) – ионы ^{12}C
 (* – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$)

Результаты МТТ-теста демонстрируют зависимость жизнеспособности клеток hTERT от типа ионизирующего излучения и доксорубина. Ионы ^{12}C проявляют наиболее выраженную цитотоксичность, дозозависимо снижая оптическую плотность от 0,47 при облучении в дозе 2 Гр до 0,08 при облучении в дозе 10 Гр. Также значительное ингибирование пролиферации характерно для протонов: наблюдается снижение оптической плотности от 0,53 при 2 Гр до 0,23 при 10 Гр, превосходящее эффект γ -излучения (при облучении в дозе 2 Гр – 0,62; при облучении в дозе 10 Гр – 0,26). Комбинированное действие ионов ^{12}C и доксорубина продемонстрировало наиболее выраженный синергический

эффект, приводящий к снижению оптической плотности с 0,08 до 0,05 при облучении в дозе 10 Гр.

На рисунке 28 продемонстрированы результаты МТТ-теста для клеток карциномы шейки матки линии HeLa.

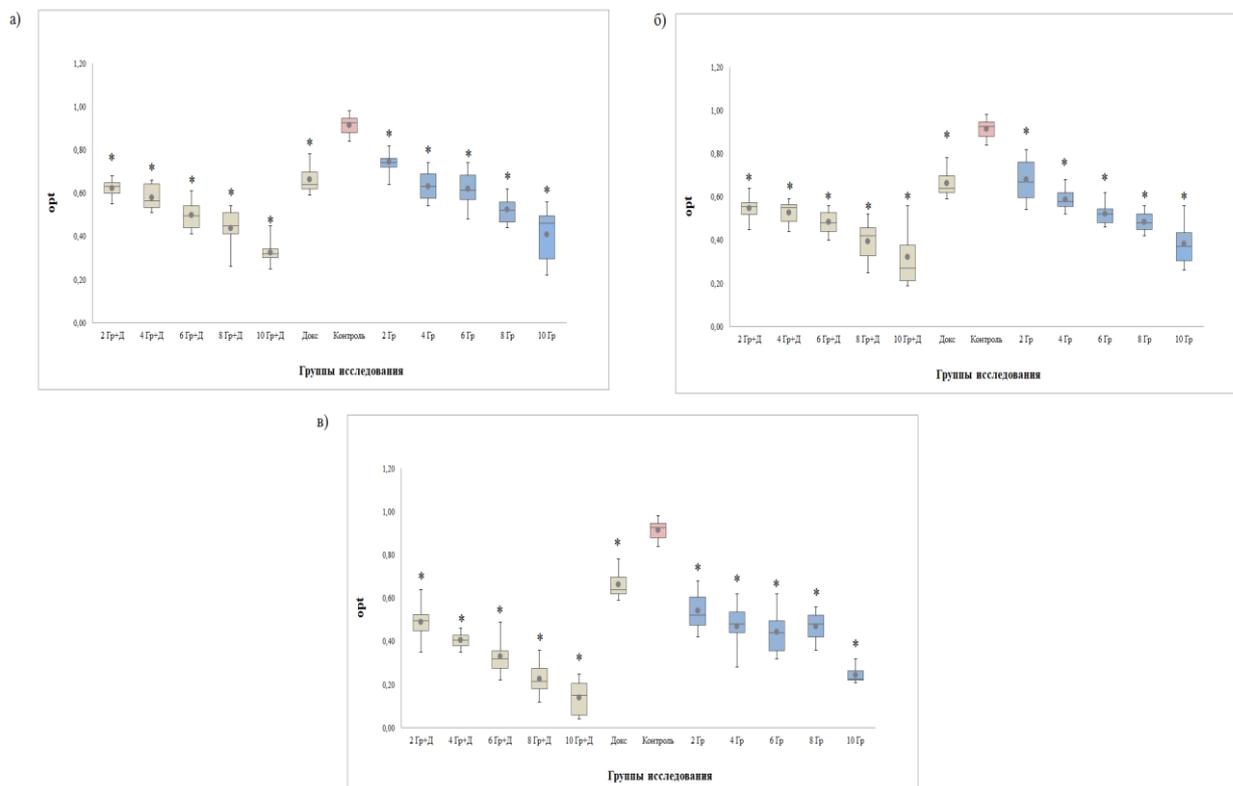


Рисунок 28 – Сравнение оптической плотности клеток линии HeLa:
 а) – γ -излучение; б) – протоны; в) – ионы ^{12}C
 (* – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$)

Полученные экспериментальные данные убедительно демонстрируют, что для всех исследованных видов излучения наблюдается снижение оптической плотности, напрямую зависящее от дозы: γ -излучение (при облучении в дозе 2 Гр – 0,74; при облучении в дозе 10 Гр – 0,41), протоны (при облучении в дозе 2 Гр – 0,68; при облучении в дозе 10 Гр – 0,38), ионы ^{12}C (при облучении в дозе 2 Гр – 0,54; при облучении в дозе 10 Гр – 0,25). Важно отметить, что доксорубицин проявлял умеренную цитотоксичность (показатель оптической плотности составил 0,66). Примечательно, что характерной особенностью наблюдаемых эффектов является синергическое усиление цитотоксического действия применяемых агентов. Данное наблюдение представляет собой достоверное

дополнительное снижение оптической плотности, превышающее изменения, обусловленные исключительно воздействием ионизирующего излучения.

На рисунке 29 показаны результаты анализа метаболической активности для клеток гепатокарциномы линии HUH-7.

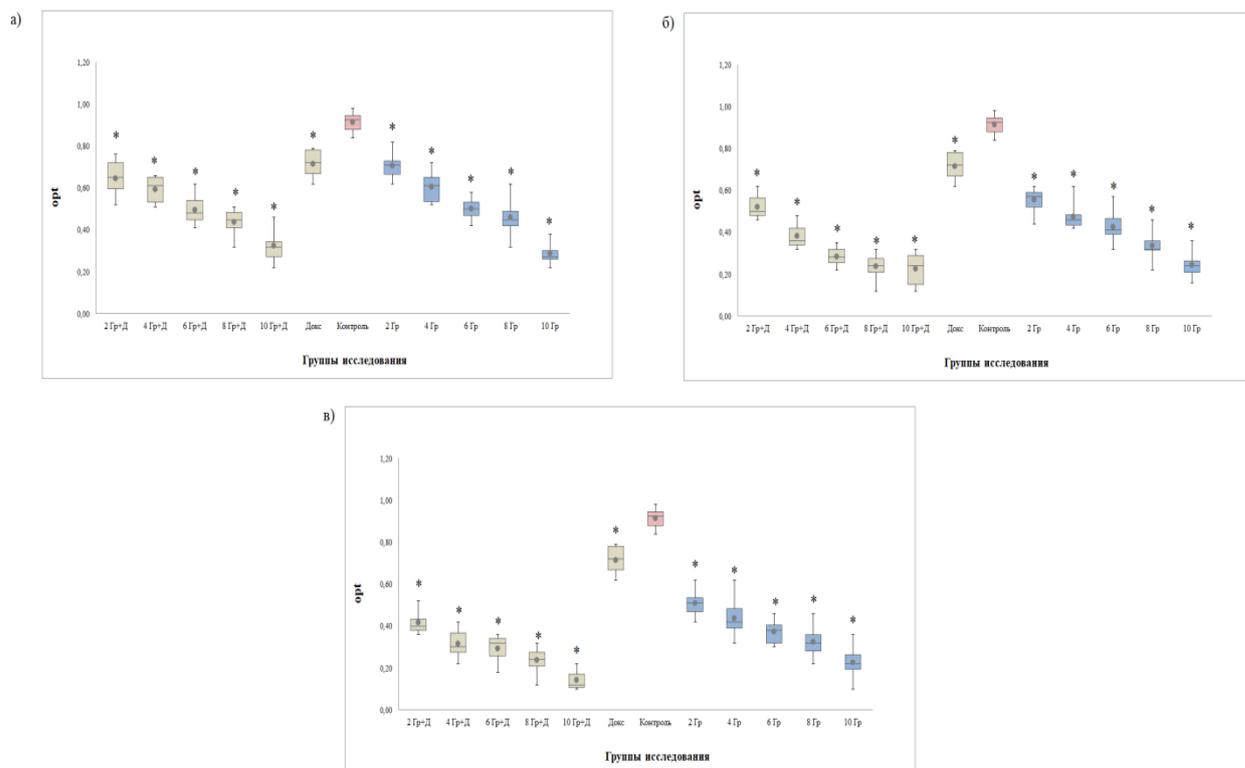


Рисунок 29 – Сравнение оптической плотности клеток линии HUH-7:

а) γ -излучение; б) – протоны; в) – ионы ^{12}C

(* – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$)

Установлено, что ионы ^{12}C оказывали наиболее выраженный цитотоксический эффект, снижая оптическую плотность клеток гепатокарциномы линии HUH-7. При облучении данной линии ионами углерода оптическая плотность снижалась с 0,51 до 0,23. Данный цитотоксический эффект значительно превосходил тот, что был зарегистрирован для протонов. В этом случае показатель оптической плотности снижался с 0,56 до 0,24. Действие гамма-излучения на клетки гепатокарциномы оказало наименьшее воздействие. Вследствие этого оптическая плотность регистрировалась на уровне 0,71 при облучении в дозе 2 Гр и 0,29 при облучении в дозе 10 Гр. Следует отметить, что цитотоксическое действие химиопрепарата было незначительным, о чем

свидетельствует показатель оптической плотности, составивший 0,72. Тогда как, комбинированное действие химиопрепарата и ионизирующего излучения привело к синергическому усилению цитотоксического эффекта, наиболее выраженному при более высоких дозах облучения. В частности, для ионов ^{12}C наблюдалось снижение оптической плотности до 0,32 при облучении в дозе 4 Гр и до 0,14 при облучении в дозе 10 Гр.

На рисунке 30 представлены данные, характеризующие метаболическую активность клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2).

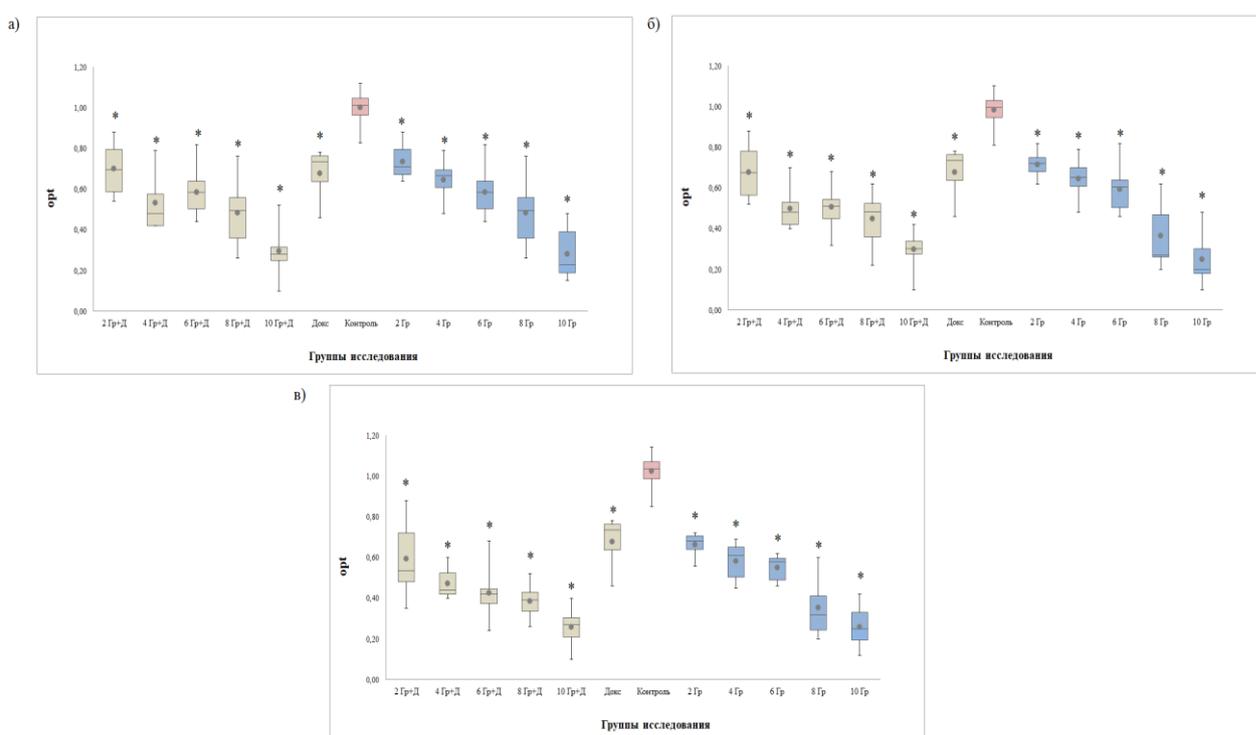


Рисунок 30 – Сравнение оптической плотности клеток линии SK-N-BE(2):
 а) γ -излучение; б) – протоны; в) – ионы ^{12}C
 (* – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$)

На основе данных, представленных на рисунке 30, видно, что при облучении клеток нейробластомы в максимальной дозе, наиболее выраженный цитотоксический эффект наблюдался при воздействии ионов ^{12}C (показатель оптической плотности составил 0,25). Тогда как показатель оптической плотности опухолевых клеток при воздействии протонов составил 0,26. В случае γ -излучения значение оптической плотности составило 0,28. Химиотерапевтический агент продемонстрировал умеренную цитотоксичность, о

чем свидетельствует показатель оптической плотности, равный 0,68. Примечательно, что комбинированное действие агентов вызывало синергический рост цитотоксичности, который был особенно выражен при использовании высоких доз ионизирующего излучения.

Таким образом, результаты МТТ-анализа, проведенного на пяти клеточных линиях (MCF-7, HeLa, HUH-7, SK-N-BE(2), hTERT), демонстрируют значительную вариабельность ответа на воздействие исследуемых факторов. Все клеточные линии показали снижение жизнеспособности клеток после облучения, однако степень этого снижения существенно различалась. Наиболее выраженную чувствительность к протонам и ионам ^{12}C в комбинации с доксорубицином продемонстрировала линия MCF-7, проявляя синергический эффект (показатели оптической плотности составили 0,15 и 0,12 соответственно). Клетки фибробластов линии hTERT демонстрировали высокую чувствительность к протонам и ионам ^{12}C , в то время как клеточные линии HeLa и HUH-7 характеризовались умеренной радиочувствительностью ко всем видам излучения и комбинированной терапии (для γ -излучения показатели оптической плотности составили 0,33 и 0,32, для протонов – 0,32 и 0,23, для ионов углерода – 0,14 и 0,16 соответственно). Отличительной чертой является выраженная резистентность клеток нейробластомы к воздействию всех видов ионизирующего излучения, обнаруженная как в условиях монотерапии, так и при их комбинированном применении.

Результаты проведенного анализа выявили значительную вариабельность радиочувствительности опухолевых клеток. Это наблюдение подчеркивает необходимость разработки персонализированных подходов к комбинированной химиолучевой терапии с целью оптимизации радиотерапевтического эффекта. В этой связи, дальнейшие исследования направлены на изучение молекулярных механизмов, обуславливающих выявленные различия.

3.4 Сравнение клеточных линий по выраженности радиобиологических эффектов

Выраженность проявления радиобиологических эффектов оценивали, основываясь на шкале ранжирования, состоящей из 5 ступеней – от 1 до 5 (по количеству исследуемых клеточных линий). Ранжирование проводилось по каждому из изученных показателей: выживаемость (по способности клеток образовывать колонии), время удвоения (пролиферативная активность), метаболическая активность (по результатам МТТ-теста) и чувствительность к доксорубину. Клеточной линии присваивали ранг, где единица соответствовала максимальной радиочувствительности (минимальная выживаемость, наибольшее время удвоения и минимальная метаболическая активность), а показатель 5 – клеточной линии, у которой наблюдалась наибольшая радиорезистентность (максимальная выживаемость, наименьшее время удвоения и максимальная метаболическая активность).

Каждый показатель был зарегистрирован при облучении в дозе 4 Гр (за исключением группы с доксорубином). Такой выбор обусловлен необходимостью оптимизации экспериментального дизайна для выявления различий в клеточном ответе. Ранее продемонстрировано, что при облучении клеток в дозе 4 Гр ионами ^{12}C выживаемость клеток линии SK-N-BE(2) снизилась на 64%, HUH-7 – на 55%, HeLa – на 70%, а MCF-7 – на 40%. В свою очередь, более высокие дозы (6, 8, 10 Гр) демонстрируют эффект насыщения: дальнейшее увеличение дозы в меньшей степени способствует снижению клоногенной активности, что иллюстрируется небольшим различием в выживаемости. Характер ответа клеток карциномы шейки матки на облучение имел наибольшую динамику при облучении в дозах 2 Гр и 4 Гр, где снижение выживаемости регистрировалось на 42% и 70%. В противоположность этому, при более высоких дозах (6 Гр и 10 Гр), снижение выживаемости на 80% и 92% демонстрировало более постепенный характер изменений. В связи с этим, доза 4 Гр обеспечивает оптимальный баланс между индукцией ответа для обнаружения различий в

радиочувствительности и сохранением достаточного количества клеток для высококачественного анализа.

На рисунке 31 графически представлены результаты ранжирования, отражающие радиочувствительность клеточных линий по показателям выживаемости, времени удвоения (тудв), метаболической активности (МТТ) и чувствительность к доксорубцину (Докс).

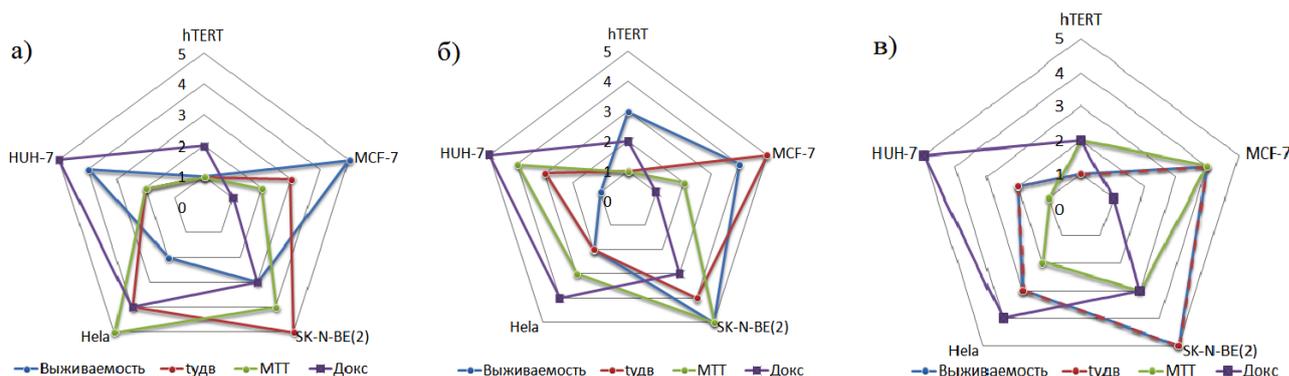


Рисунок 31 – Результаты ранжирования, отражающие радиочувствительность клеточных линий, исходя из характера радиобиологического ответа: а) – ионы ^{12}C ; б) – γ -излучение; в) – протоны

Анализ радиочувствительности клеточных линий MCF-7, HUH-7, HeLa, hTERT и SK-N-BE(2) к действию γ -излучения, протонов и ионов ^{12}C , оцененной по пятибалльной шкале, выявил дифференцированный клеточный ответ в зависимости от типа излучения и используемого параметра.

Первоначально была проведена оценка чувствительности исследуемых клеточных линий к доксорубцину. На основе полученных данных, клеткам линии MCF-7 был присвоен наивысший ранг чувствительности (ранг 1), в то время как нормальные клетки фибробластов линии hTERT отнесены к рангу 2. Это различие в чувствительности может быть объяснено несколькими факторами. Во-первых, предполагается, что резистентность фибробластов к доксорубцину может быть связана с их специфическим распределением по фазам клеточного цикла. Значительная доля этих клеток находится в G0-фазе, что отражает их низкую пролиферативную активность в отличие от быстро делящихся опухолевых клеток. Учитывая, что доксорубцин проявляет максимальную цитотоксичность в отношении клеток, активно проходящих S-фазу клеточного

цикла, низкая доля пролиферирующих фибробластов может способствовать их пониженной восприимчивости к данному химиотерапевтическому агенту. Во-вторых, различия в чувствительности могут быть обусловлены вариациями в экспрессии ключевых молекулярных мишеней доксорубина. Известно, что доксорубин ингибирует топоизомеразу II и вызывает повреждение ДНК. Вероятно, более низкая экспрессия топоизомеразы II и/или повышенная эффективность систем репарации ДНК и антиоксидантной защиты в фибробластах по сравнению с опухолевыми клетками приводят к снижению цитотоксического эффекта доксорубина.

После определения ранжирования клеточных линий по чувствительности к доксорубину, была проведена комплексная оценка их клоногенной, пролиферативной и метаболической активностей.

Клеточная линия hTERT продемонстрировала наивысшую чувствительность к действию протонов и ионов ^{12}C по выживаемости (клоногенная активность, ранг 1), в то время как при действии γ -излучения клетки данной линии занимают ранг 3. По показателю времени удвоения (пролиферативная активность) линия hTERT для всех видов излучения занимает ранг 1. По показателю метаболической активности (МТТ) клетки фибробластов наиболее чувствительны к действию ионов ^{12}C и γ -излучению (ранг 1), в то время как при действии протонов им присвоен ранг 2.

Клеточная линия MCF-7 продемонстрировала выраженную резистентность к действию γ -излучения и протонам (ранг 4), а также к ионам ^{12}C (ранг 5), проявляющуюся в минимальном снижении клоногенной активности по отношению к другим опухолевым клеткам. В свою очередь, клетки HeLa и HUH-7 показали сходный ответ на действие протонов, характеризующийся промежуточными значениями рангов (ранг 3 и 2 соответственно). При этом, клеточная линия SK-N-BE(2) проявляет максимальную резистентность к действию γ -излучения и протонов, что отражено в присвоении максимального ранга.

Оценка пролиферативной активности, основанная на измерении времени удвоения, выявила существенную радиорезистентность клеточной линии SK-N-BE(2) ко всем исследованным видам ионизирующего излучения (γ -излучение, протоны, ионы ^{12}C), что подтверждается присвоением высокого ранга, в то время как клетки HeLa и HUH-7 продемонстрировали промежуточный уровень радиочувствительности. Результаты показали наиболее выраженное подавление метаболических процессов в линии MCF-7 при облучении как γ -излучением, так и ионами ^{12}C (ранг 1).

Таким образом, выявлено, что клеточная линия MCF-7 демонстрирует более высокую чувствительность к доксорубину и наиболее выраженное снижение метаболической активности среди исследуемых опухолевых клеточных линий при облучении как ионами ^{12}C , так и γ -излучением. Параллельно, клетки нейробластомы линии SK-N-BE(2) продемонстрировали выраженную радиорезистентность к воздействию различных типов ионизирующего излучения. Это подтверждается высокими рангами по показателям времени удвоения (действие ионов ^{12}C , действие протонов), выживаемости (действие протонов, действие γ -излучения) и метаболической активности (действие γ -излучения).

3.5 Анализ выживаемости методом проточной цитометрии

Для дальнейших исследований были выбраны две клеточные линии, демонстрирующие контрастный ответ в отношении терапевтических воздействий: клетки MCF-7, продемонстрировавшие максимальную чувствительность к доксорубину среди исследованных линий, и клетки SK-N-BE(2), отличающиеся выраженной резистентностью к ионизирующему излучению, подтвержденной высокими значениями клоногенной активности и коротким временем удвоения. Данный выбор обусловлен необходимостью углубленного изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе гетерогенности радиочувствительности и лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

На основании вышеизложенного, в рамках исследования была проведена оценка жизнеспособности клеточных линий MCF-7 и SK-N-BE(2) методом проточной цитометрии. На преаналитическом этапе после процедуры облучения проводилась прямая реакция иммунофлуоресценции с клеточной суспензией, согласно стандартной методике. После окрашивания моноклональными антителами проба анализировалась на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Проводился одновременный анализ не менее 100 000 клеток пробы. На рисунке 32 представлены результаты проточно-цитометрического анализа выживаемости клеток линии MCF-7 после воздействия γ -излучения.

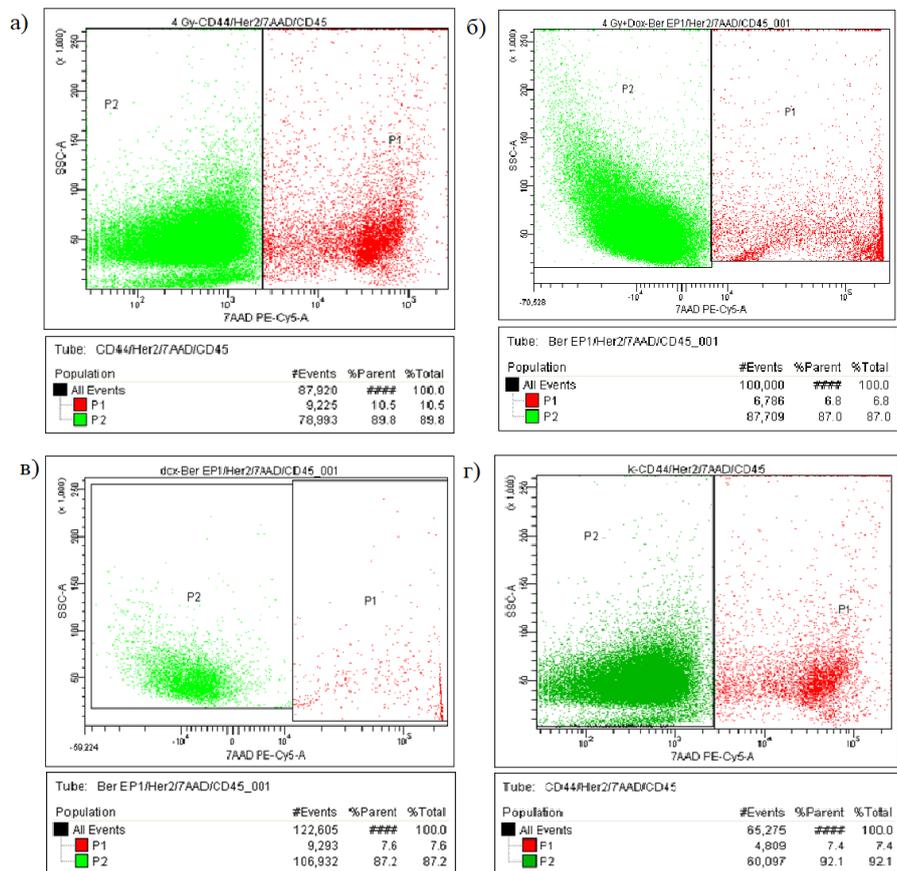


Рисунок 32 – Цитометрический анализ клеток MCF-7 с применением ядерного красителя 7-AAD. Выделение 7-AAD – положительных событий:
 а) – воздействие γ -излучения; б) – комбинированное действия доксорубина и γ -излучения; в) – воздействия доксорубина; г) – контроль

Результаты анализа выживаемости клеток MCF-7 с применением красителя 7-AAD во всех экспериментальных группах, полученные с помощью программы BD FACSDiva, представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Анализ жизнеспособности клеток MCF-7 с помощью 7-AAD

Исследуемая группа	Выживаемость, %		
	Протоны	^{12}C	^{60}Co
Контроль	92,10 ± 2,40	92,10 ± 2,40	92,10 ± 2,40
Докс	87,20 ± 1,71*	87,20 ± 1,71*	87,20 ± 2,71*
4 Гр	75,80 ± 3,04*	71,60 ± 2,25*	89,80 ± 1,25*
4 Гр+Докс	67,80 ± 1,41**	62,00 ± 2,69**	87,00 ± 1,70*

Примечание – * – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$; ** – достоверное отличие от группы с действием доксорубина при $p < 0,05$

Результаты исследования демонстрируют, что воздействие на клетки химиопрепарата доксорубина в концентрации 0,004 мг/мл вызывает статистически значимое снижение выживаемости, достигающее 4,90% по сравнению с контрольной группой. Данный эффект находится в соответствии с общепринятым механизмом действия доксорубина, заключающимся в ингибировании активности топоизомеразы II, последующем накоплении повреждений ДНК и, как следствие, активации каскада апоптотических процессов.

Отмечено, что воздействие ионизирующего излучения в дозе 4 Гр выявило прямую зависимость между цитотоксическим эффектом и ЛПЭ: протоны и ионы ^{12}C вызвали значительное снижение выживаемости клеток (на 16,30% и 20,50% соответственно).

Комбинированное действие доксорубина и ионизирующего излучения продемонстрировало синергический эффект, наиболее выраженный при использовании протонов (снижение выживаемости на 24,30%, $p < 0,05$ по сравнению с монотерапией протонами) и ионов ^{12}C (снижение на 30,10%, $p <$

0,05), что, можно объяснить ингибированием доксорубицином процессов репарации ДНК, дополнительно усиливающих цитотоксический эффект ионизирующего излучения. Отсутствие подобного синергизма при комбинированном действии γ -излучения и доксорубицина подтверждает критическую роль высокой ЛПЭ в механизме усиления цитотоксического эффекта.

Аналогично был проведен анализ жизнеспособности клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) с использованием проточной цитометрии и флуоресцентного красителя 7-AAD. Количественная оценка осуществлялась путем определения процента 7-AAD-положительных клеток, отражающего проницаемость клеточной мембраны и, следовательно, наличие повреждений, характерных для поздних стадий апоптоза.

На рисунке 33 продемонстрированы данные выживаемости клеток линии SK-N-BE(2) для группы с γ -излучением, полученные методом проточной цитометрии.

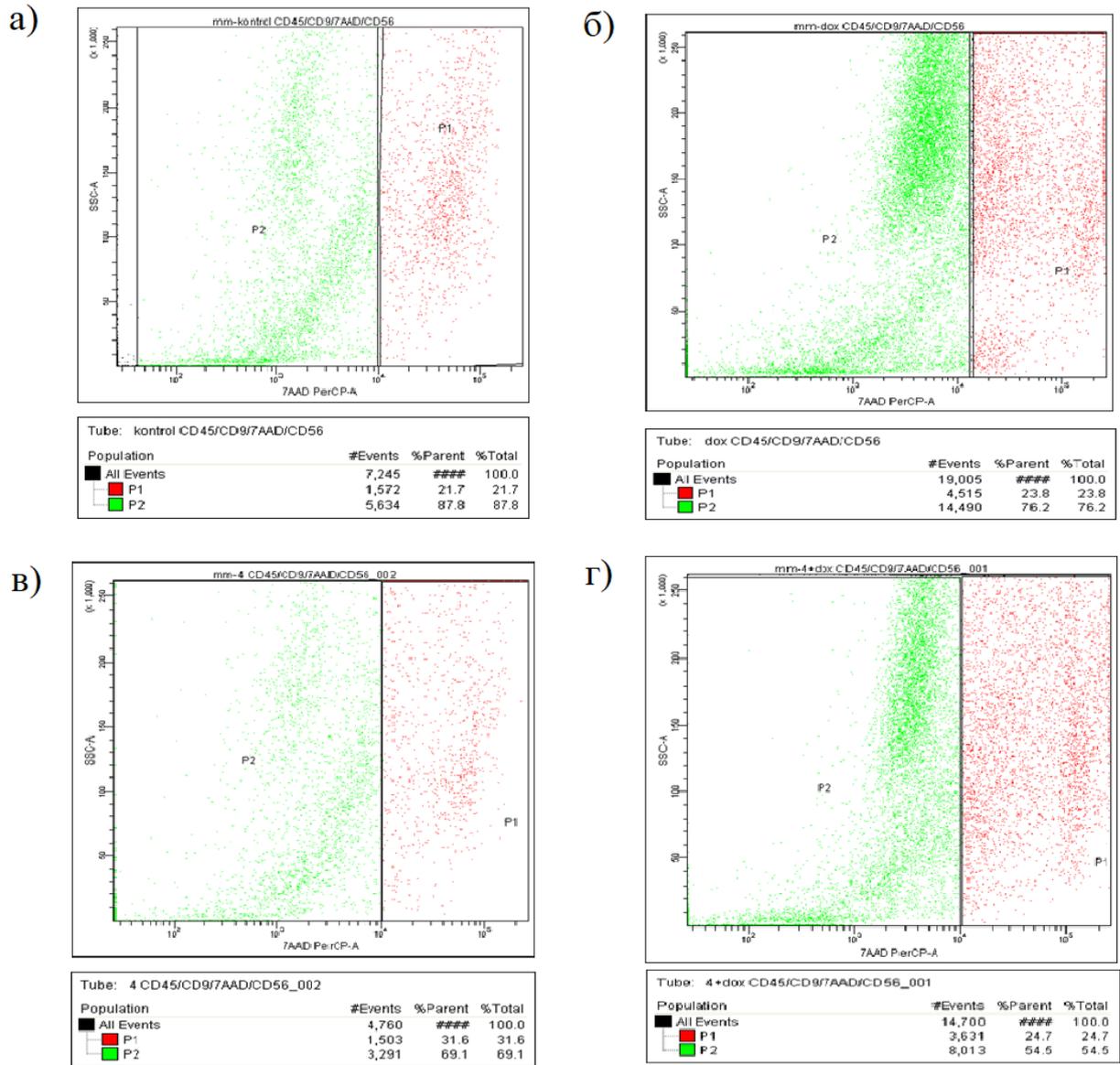


Рисунок 33 – Цитометрический анализ клеток SK-N-BE(2) с применением ядерного красителя 7-AAD. Выделение 7-AAD – положительных событий: а) – контроль; б) – воздействие доксорубина; в) – воздействие γ -излучения; г) –комбинированное действие доксорубина и γ -излучения

Результаты анализа выживаемости клеток линии SK-N-BE(2) с помощью красителя 7-AAD во всех экспериментальных группах, полученные с помощью программы BD FACSDiva, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Анализ жизнеспособности клеток SK-N-BE(2) с помощью 7-AAD

Исследуемая группа	Выживаемость, %		
	Протоны	^{12}C	^{60}Co
Контроль	$87,80 \pm 3,20$	$87,80 \pm 3,20$	$87,80 \pm 3,20$
Докс	$76,20 \pm 2,40^*$	$76,20 \pm 2,40^*$	$76,20 \pm 2,40^*$
4 Гр	$57,20 \pm 2,10^*$	$55,30 \pm 1,90^*$	$69,10 \pm 1,90^*$
4 Гр+Докс	$45,20 \pm 2,10^{**}$	$43,20 \pm 2,10^{**}$	$54,50 \pm 2,60^{**}$

Примечание – * – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$; ** – достоверное отличие от группы с действием доксорубицина при $p < 0,05$

Согласно данным, представленным в таблице 9, показано, что все группы исследования продемонстрировали значительное ингибирование роста и пролиферации клеток SK-N-BE(2). При этом наблюдается существенная вариабельность ответа в зависимости от типа излучения и присутствия доксорубицина. В контрольной группе выживаемость клеток составила $87,80 \pm 3,20\%$. Обработка клеток доксорубицином приводила к снижению жизнеспособности клеток ($76,20 \pm 2,40\%$).

Выживаемость клеток нейробластомы составила при воздействии протонов в дозе 4 Гр – $57,20 \pm 2,10\%$, ионов ^{12}C – $55,30 \pm 1,90\%$, γ -излучения – $69,10 \pm 1,90\%$. Выживаемость клеток при комбинированном действии доксорубицина и протонов составила $45,20 \pm 2,10\%$, доксорубицина и ионов ^{12}C – $43,20 \pm 2,10\%$ (наибольшее снижение выживаемости), доксорубицина и γ -излучения – $54,50 \pm 2,60\%$, демонстрируя синергический эффект.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют выраженный цитотоксический эффект доксорубицина на клетки SK-N-BE(2), что согласуется с его механизмом действия. Ионы ^{12}C приводят к значительно более высокому уровню повреждения ДНК по сравнению с протонами или γ -излучением. Наблюдаемый синергизм между ионизирующим излучением, особенно ионами ^{12}C , и доксорубицином свидетельствует о потенциале повышения эффективности терапии нейробластомы за счет комбинированного применения этих методов.

3.6 Анализ генов-кандидатов, вовлеченных в регуляцию апоптоза

Для определения функциональных характеристик генов и выявления их роли в биологических процессах был проведен биоинформатический анализ с использованием общедоступной базы данных белковых последовательностей UniProt. Методология анализа заключалась в сопоставлении нуклеотидных последовательностей исследуемых генов с аннотированными записями в UniProt, что позволило идентифицировать предполагаемые функции кодируемых ими белков. На основании проведенного анализа и применения установленных критериев отбора были идентифицированы гены-кандидаты, демонстрирующие потенциальную значимость для дальнейших исследований, детальная информация о которых представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Молекулярные механизмы регуляции апоптоза

Ген	Uniprot ID	Название белков	Функция
Ингибиторы апоптоза/ Анти-апоптотические белки			
BIRC5, Apoptosis inhibitor survivin	O15392	Белок, содержащий бакуловирусный IAP-повтор 5	Способствует пролиферации клеток, предотвращает апоптоз (G2/M).
Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large)	Q07817	Bcl-2-подобный белок 1, Регулятор апоптоза Bcl-X	Предотвращает высвобождение цитохрома C за счет взаимодействия с проапоптотическими белками.
Bcl-2 (Apoptosis regulator Bcl-2)	P10415	Член семейства белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2)	Контролирует проницаемость митохондриальной мембраны. Подавляет активность каспазы, предотвращая высвобождение цитохрома C.
Mcl-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1)	Q07820	Индукцированный белок дифференцировки клеток миелоидного лейкоза Mcl-1	Взаимодействует с проапоптотическими белками семейства BH3-only.
Bcl-W, Bcl2-L-2 (Bcl-2- like protein 2)	Q92843	Bcl-2-подобный белок 2	Ингибирует активность проапоптотических белков. Ингибирует высвобождение цитохрома C из митохондрий.
BCL2A1 (Bcl-2-related protein A1)	Q16548	Белок, связанный с Bcl-2, A1	Блокирует апоптоз за счет взаимодействия с белками семейства BH3-only

Продолжение таблицы 10

Проапоптотические белки			
РМАIP1 (Noxa)	Q13794	Форбол-12-миристан-13-ацетат-индуцированный белок 1 (Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)	Семейство Bcl-2, BH3-only. Способствует активации каспаз и апоптозу. Способствует изменениям митохондриальной мембраны и выходу апоптогенных белков из митохондрий. Способствует p53/TP53-зависимому апоптозу после радиационного облучения.
Bax, Bcl2-L-4 (Bcl-2-like protein 4)	Q07812	X-белок, ассоциированный с Bcl-2, bcl-2-подобный белок 4	В ответ на апоптотические сигналы, изменяет свою конформацию, встраивается в наружную мембрану митохондрий, приводя к образованию пор.
Bim, BCL2L11 (Bcl-2-like protein 11)	O43521	Белок, подобный Bcl-2, 11	Взаимодействует с другими членами семейства белков BCL-2, действуя как активатор апоптоза.
Bad (Bcl2 associated agonist)	Q92934	Bcl2-ассоциированный агонист клеточной гибели	Связывается с антиапоптотическими белками Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1, высвобождая Bax/Bak для инициации апоптоза. Способствует высвобождению цитохрома C из митохондрий в цитозоль.
Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), BBC3 (Bcl-2-binding component 3, isoforms 1/2)	Q9VXH1	p53-индуцированный модулятор апоптоза. Bcl-2-связывающий компонент 3 (BBC3)	Важный медиатор p53/TP53-зависимого и p53/TP53-независимого апоптоза. Связывается с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, нейтрализуя их ингибиторную активность

Вследствие того, что настоящее исследование направлено на анализ экспрессии генов, кодирующих белки, критически вовлеченные в регуляцию апоптоза, были отобраны представители двух основных семейств белков, контролирующих этот процесс: семейство ингибиторов апоптоза (IAP) и семейство Bcl-2. Семейство IAP представлено геном *BIRC5* (кодирующим Survivin), известным своим участием в ингибировании каспаз и подавлении апоптоза на различных стадиях.

Также для комплексного анализа регуляции апоптоза в данной работе исследуется экспрессия генов семейства Bcl-2, представленного как антиапоптотическими (Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1/A1), так и проапоптотическими (PMAIP1, Bax, Bak, Bim, Bad, Puma) белками.

Выбор данных представителей обусловлен их функциональным разнообразием и ключевой ролью в контроле митохондриально-зависимого пути апоптоза. Антиапоптотические белки регулируют пермеабиллизацию наружной мембраны митохондрий, подавляя активацию каспаз и других эффекторных молекул.

Проапоптотические белки инициируют апоптоз, взаимодействуя (гомо- или гетеродимеризация) с антиапоптотическими белками, либо активируя каспазный каскад и индуцируя митохондриальную дисфункцию. Сравнительный анализ их экспрессии позволит определить баланс про- и антиапоптотических сигналов и выявить доминирующие механизмы регуляции апоптоза.

Таким образом, для комплексного анализа апоптотической регуляции были выбраны гены *BIRC5* и *PMAIP1*, кодирующие соответственно антиапоптотический белок Survivin и проапоптотический белок Noxa. Их антагонистическое действие на каспазную каскадную реакцию – ингибирование (Survivin) и активация (Noxa) – делает их идеальными маркерами для оценки баланса между выживанием и гибелью клеток. Анализ экспрессии этих генов позволяет оценить состояние апоптотических сигнальных путей, что особенно актуально при исследовании патологических процессов, таких как онкогенез, характеризующихся дисрегуляцией апоптоза.

Перечень модельных генов, использованных в данном исследовании представлен в таблице 11.

Таблица 11 – Модельные гены для анализа апоптотических путей

Ген	Uniprot ID	Название	Функция
<i>BIRC5</i>	O15392	Белок, содержащий бакуловирусный IAP-повтор 5 (бакуловирусный ингибитор мотива апоптозных повторов 5)	Способствует пролиферации клеток, предотвращает апоптоз (G2/M), Необходим для поддержания целостности и функции митохондрий.
<i>PMAIP1</i> (Noxa)	Q13794	Форбол-12-миристат-13-ацетат-индуцированный белок 1	Способствует активации каспаз и апоптозу. Способствует изменениям митохондриальной мембраны и выходу апоптогенных белков из митохондрий. Способствует p53/TP53-зависимому апоптозу после радиационного облучения. Способствует протеасомной деградации MCL1.
<i>GAPDH</i>	P04406	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Ген «домашнего хозяйства»	Ключевой фермент гликолиза, превращает D-глицеральдегид-3-фосфат (G3P) в 3-фосфо-D-глицероилфосфат.

В таблице отражены UniProt ID для каждого исследуемого гена, что подтверждает идентификацию и позволяет получить доступ к обширной информации как о структуре белка Survivin: взаимодействиях и роли в ингибировании апоптоза, так и для белка Noxa, обеспечивая доступ к детальной информации об этом проапоптотическом белке, его участии в митохондриальном пути апоптоза и активации каспаз. В качестве гена внутренней нормализации (ген «домашнего хозяйства») в исследование включен ген *GAPDH*. Его стабильная экспрессия в большинстве клеток позволяет корректировать вариации в количестве РНК, обеспечивая более точный анализ относительной экспрессии *BIRC5* и *PMAIP1*.

3.6.1 Биоинформатический анализ. Анализ белок-белковых взаимодействий

С помощью базы данных STRING была построена сеть белок-белковых взаимодействий (ББВ) для генов *PMAIP1* и *BIRC5*. STRING предлагает инструменты для визуализации взаимодействий в виде сетей (networks), что

позволяет увидеть связи между множеством белков [146]. Наличие ББВ измеряется количественно, и, как следствие, такой оценки является «коэффициент достоверности», диапазон которого находится от 0 до 1. Взаимодействия, подтвержденные экспериментально, имеют более высокую оценку доверия, чем взаимодействия, предсказанные только на основе вычислительных методов. Более высокое доверие указывает на более вероятное взаимодействие.

В собственном исследовании учитывались только экспериментально подтвержденные взаимодействия и данные из доверенных баз данных (уровень достоверности $\geq 0,9$, вид – *Homo sapiens*). Анализ результатов отображен в виде сети, где узлы представляют белки, а ребра – взаимодействия: розовым цветом отображены экспериментально определенные взаимодействия, а голубым – взаимодействия из баз данных (рисунок 34).

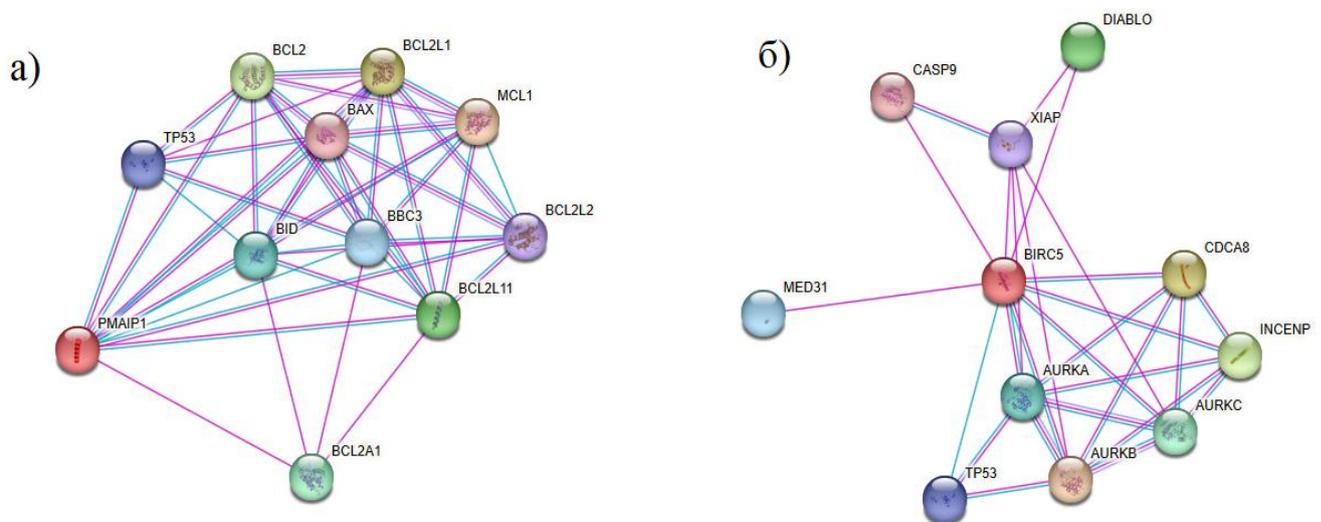


Рисунок 34 – Сеть белок-белковых взаимодействий, предсказанная базой данных String для генов *PMAIP1* (а) и *BIRC5* (б)

В представленной сети ББВ выявлены значимые связи с ключевыми регуляторами апоптоза и ответа на стресс: TP53, Bcl2, Bcl2l1, Mcl1, Bcl2l2, Bax и Bcl2l11. Эта картина согласуется с установленной ролью *PMAIP1* как проапоптотического белка. Прямое транскрипционное регулирование *PMAIP1* белком-супрессором опухолей TP53 подтверждается сильным взаимодействием,

выявленным в STRING, что указывает на его участие в p53-зависимом апоптозе. Примечательно, что *PMAIP1* проявляет двойственную роль в процессе регуляции апоптоза, заключающуюся, с одной стороны, во взаимодействии с антиапоптотическими белками Bcl2, Bcl2l1, Mcl1 и Bcl2l2 с последующим подавлением их активности, а с другой – в ассоциации с проапоптотическими белками Bax и Bcl2l11, что приводит к синергическому усилению индукции программируемой клеточной гибели.

Анализ взаимодействий *BIRC5* (Survivin) в базе данных STRING демонстрирует его тесную ассоциацию с ключевыми регуляторами митоза: Cdc20, Incenp, Aurka, Aurkb и Aurkc. *BIRC5* активно участвует в регуляции митотического цикла, а его экспрессия строго контролируется в фазах G2 и M. Сильные взаимодействия с компонентами хромосомного пассажирского комплекса – Cdc20 и Incenp – подтверждают участие *BIRC5* в контроле сегрегации хромосом. Взаимодействие с Aurora киназами (Aurka, Aurkb, Aurkc) указывает на его роль в регуляции активности этих ферментов, определяющих ключевые этапы митоза, от сборки веретена до цитокинеза.

Таким образом, ген *BIRC5*, регулируя митоз через взаимодействия с компонентами митотического веретена и Aurora киназами, поддерживает геномную стабильность. Ген *PMAIP1*, действуя как эффектор p53-зависимого пути апоптоза и взаимодействуя с про- и антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, играет критическую роль в контроле клеточного роста и ответа на стресс.

Следующий этап посвящен построению и анализу сети ББВ с использованием программного обеспечения Cytoscape (версия 3.10.3) и специализированного плагина cytoHubba, позволяющего идентифицировать ключевые узлы и подсети в сети взаимодействий. Результаты анализа и биологической интерпретации выявленных взаимодействий представлены на рисунке 35.

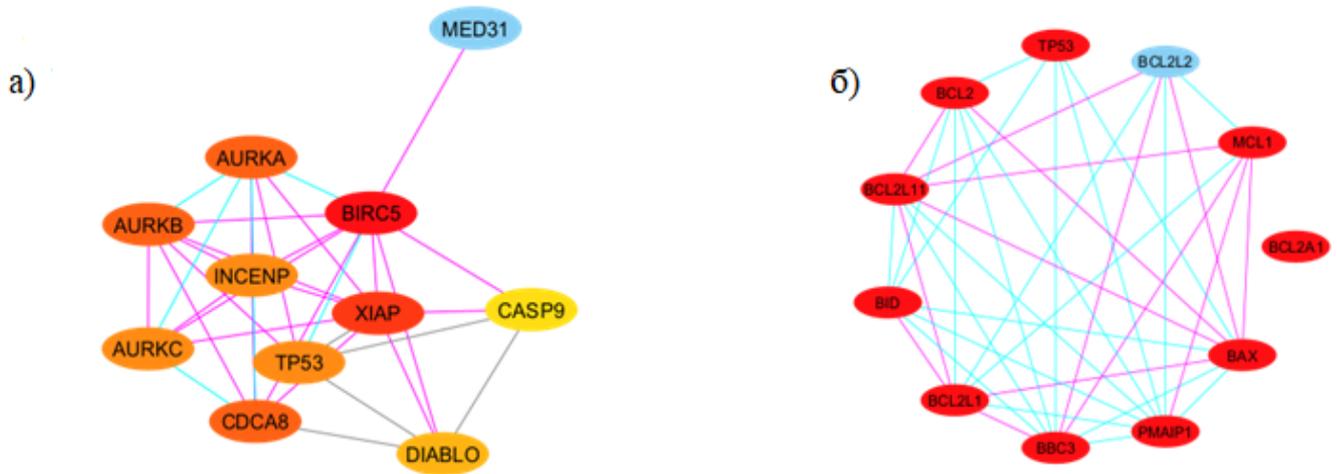


Рисунок 35 – Сеть белок-белковых взаимодействий для:
а) – *BIRC5*; б) – *PMAIP1*

Исходя из полученных данных, было оценено взаимодействие близости белков-кандидатов к белкам с известной связью: *BIRC5* с *Med31*, *Aurka*, *Aurkb*, *Aurkc*, *Incenp*, *Xiap*, *Cas9*, *Trp53*, *Cdca8*, *Diablo*, а также *PMAIP1* с *Trp53*, *Bcl2*, *Bcl2l11*, *Bid*, *Bcl2l1*, *Bbc3*, *Bax*, *Bcl2a1*, *Mcl1*, *Bcl2l2*. Распределение цветов осуществляется от красного до желтого в зависимости от коэффициента узла rank (ранг взаимодействий), синим цветом показаны соседние гены (*Med31*, *Bcl2l2*). Красным обозначены гены, имеющие коэффициент ранг 1. Ранг 2 присвоен гену *Xiap*. Оранжевым цветом отмечены гены *Aurka*, *Aurkb*, *Cdca8* (ранг 3). Генам *Incenp*, *trp53*, *Aurkc* присвоен ранг 6, *Diablo* – ранг 9, *Casp9* – ранг 10.

Затем, для определения наиболее значимых генных и клеточных процессов, в которых задействованы идентифицированные гены, проводился анализ функциональной активности с использованием ресурсов GO и KEGG.

С целью идентификации и интерпретации регуляторных взаимосвязей между генами был использован анализ GO. Данный подход позволил систематизировать гены в иерархические группы, классифицированные в соответствии с их молекулярными функциями, биологическими процессами, в которых они участвуют, и клеточными компонентами, с которыми они ассоциированы. Рисунок 36 иллюстрирует биологические процессы, в которых участвуют гены *PMAIP1* и *BIRC5*.

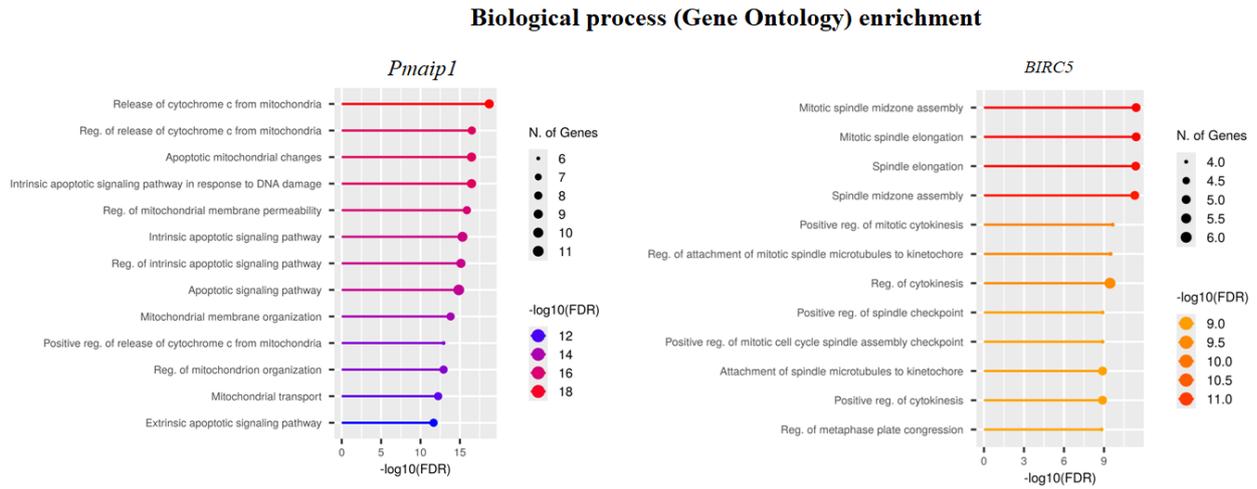


Рисунок 36 – Биологические процессы, в которые вовлечены гены *PMAIP1* и *BIRC5*. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment

Данные рисунка 36 иллюстрируют результаты анализа обогащения GO-терминов. В представленном анализе значение $-\log_{10}(\text{FDR})$, скорректированное с учетом ложноположительных результатов (метод False Discovery Rate), представляет собой меру статистической значимости обогащения каждого GO-термина: более высокие значения указывают на более высокую значимость обогащения. Размер точек на рисунке отображает количество генов, ассоциированных с каждым GO-термином.

Полученные данные указывают на вовлеченность *PMAIP1* в различные этапы митохондриально-опосредованного апоптоза. Наблюдается значимое обогащение GO-терминов, связанных с высвобождением цитохрома С из митохондрий, регуляцией этого процесса, а также апоптотическими изменениями в митохондриальной морфологии и функции. Кроме того, *PMAIP1* демонстрирует участие во внутреннем сигнальном пути апоптоза, запускаемом повреждением ДНК, что свидетельствует о его роли в контроле клеточного цикла и ответа на стресс. Анализ показал вовлеченность *PMAIP1* в регуляцию проницаемости внутренней митохондриальной мембраны, организацию митохондриальных мембран, и транспорт веществ в митохондрии. Наблюдается связь с внешним сигнальным путем апоптоза, что предполагает многогранную роль *PMAIP1* в регуляции запрограммированной клеточной гибели.

В противоположность этому, анализ GO-терминов для гена *BIRC5* выявил существенную роль в регуляции клеточного деления и контроля клеточного цикла. Результаты демонстрируют значительное обогащение GO-терминов, связанных с формированием и функционированием митотического веретена: процессы сборки, удлинения, регуляции прикрепления микротрубочек к кинетохорам хромосом – критически важного этапа для правильной сегрегации хромосом во время митоза. Показано участие *BIRC5* в регуляции цитокинеза, контрольных точек митотического цикла (в частности, контрольной точки сборки веретена), и конгрессии метафазной пластинки. Эти данные подтверждают ключевую роль *BIRC5* в обеспечении точного и упорядоченного деления клеток.

Последующий анализ, представленный на рисунке 37, позволил определить клеточные компоненты, с которыми функционально связаны гены *PMAIP1* и *BIRC5*.

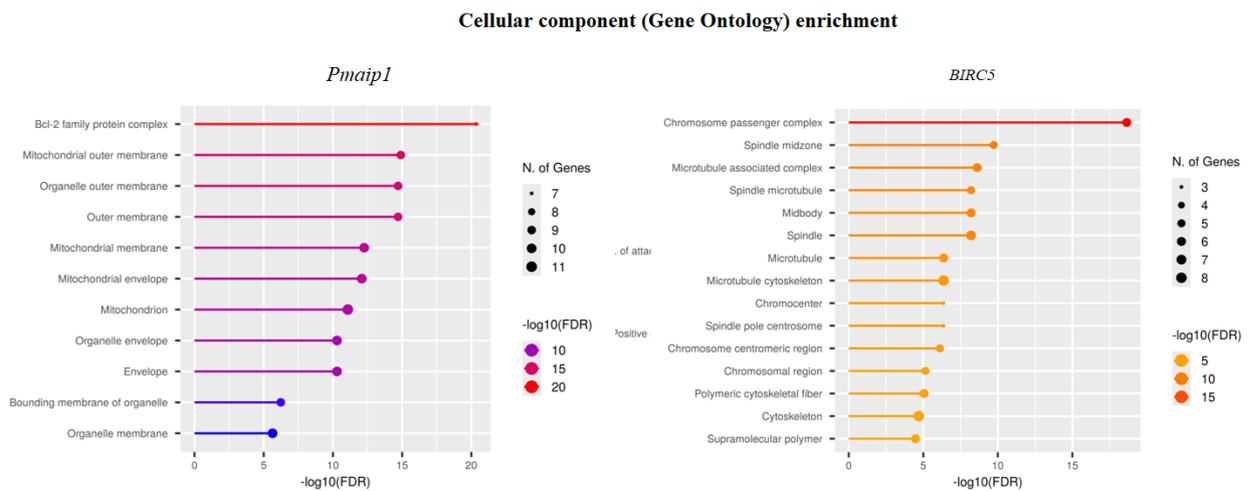


Рисунок 37 – Клеточные компоненты, в которые вовлечены гены *PMAIP1* и *BIRC5*. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment

Данные рисунка 37 демонстрируют анализ обогащения компонентов клеточных структур для генов *PMAIP1* и *BIRC5*. Для гена *PMAIP1* наблюдается значительное обогащение компонентов, связанных с митохондриями и мембранными структурами органелл. Примечательно, что анализ данных позволил установить выраженное обогащение, опосредованными белковыми комплексами семейства Bcl-2. Действительно, выявленные закономерности

подкрепляют ранее описанную функцию *PMAIP1* в контроле апоптотических каскадов, осуществляемом через взаимодействие с членами семейства Bcl-2. Кроме того, отмечается значительное обогащение генами, ассоциированными с терминами, описывающими митохондриальную мембрану, а также внешние мембраны иных органелл, что указывает на потенциальную роль изучаемых генов в регуляции функционирования данных структур.

В противоположность этому, анализ GO для гена *BIRC5* демонстрирует обогащение компонентов, участвующих в клеточном делении и организации цитоскелета. Наиболее значимым является обогащение по термину «хромосомный пассажирский комплекс» (Chromosome passenger complex), что согласуется с установленной ролью *BIRC5* в регуляции митоза и цитокинеза. Дальнейшее обогащение по терминам «центральное веретено» (Spindle midzone), «белки, ассоциированные с микротрубочками» (Microtubule associated complex), «микротрубочки веретена» (Spindle microtubule), «веретено» (Spindle), «микротрубочки» (Microtubule) и другим компонентам цитоскелета подтверждает участие *BIRC5* в формировании и функционировании митотического веретена, а также в организации цитоскелета в процессе клеточного деления.

Таким образом, анализ GO по клеточным компонентам подтверждает функциональное разделение ролей *PMAIP1* и *BIRC5*: *PMAIP1*, локализованный преимущественно на митохондриях, играет ключевую роль в регуляции апоптоза, в то время как *BIRC5* участвует в регуляции клеточного деления, формировании и функционировании митотического веретена и организации цитоскелета. Эти результаты подчеркивают фундаментальную роль обоих генов в контроле клеточного цикла и гомеостаза.

На основе анализа данных GO-терминов, были выявлены молекулярные функции, в которых участвуют гены *PMAIP1* и *BIRC5* (рисунок 38).

Molecular function (Gene Ontology) enrichment

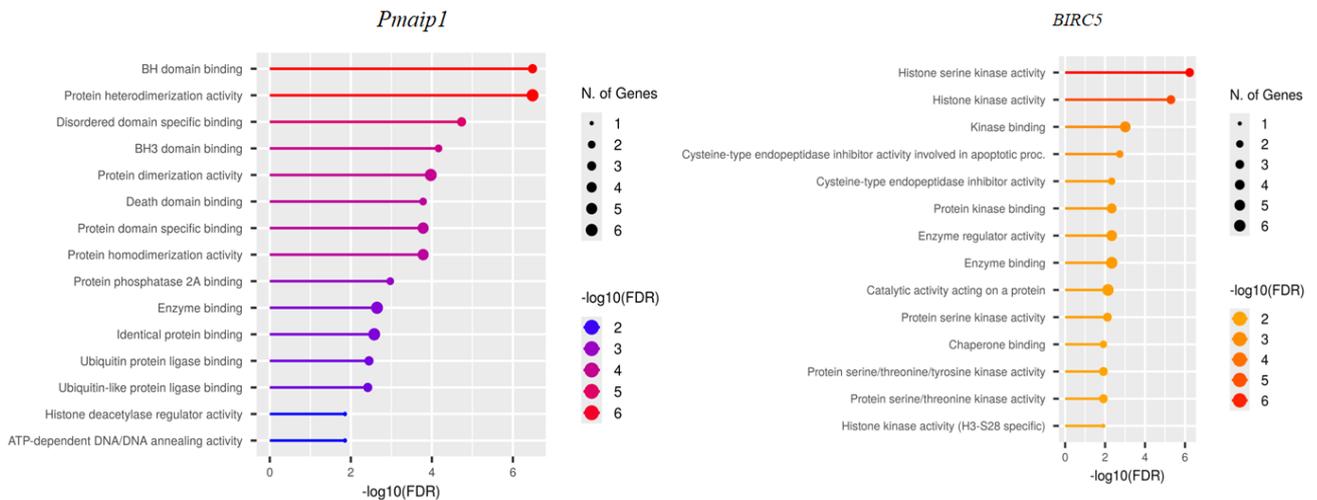


Рисунок 38 – Молекулярные функции, в которые вовлечены гены *PMAIP1* и *BIRC5*. Данные ранжированы по значениям Fold Enrichment

Исходя из данных рисунка 38, анализ молекулярных функций *PMAIP1* и *BIRC5* выявил их различные, но взаимодополняющие роли. Функциональная аннотация гена *PMAIP1* указывает на преобладание молекулярных функций, связанных с ББВ. Анализ показал значительное обогащение GO-терминов, описывающих связывание белков, включая взаимодействие с доменами BH, BH3 и death domain, а также гетеро- и гомодимеризацию. Эти данные свидетельствуют о ключевой роли *PMAIP1* в формировании многобелковых комплексов и участии в сигнальных путях, где ББВ играют критическую роль в передаче сигнала.

В отличие от *PMAIP1*, функциональная аннотация гена *BIRC5* отличается преобладанием киназной активности. Анализ GO выявил значительное обогащение терминов, связанных с киназами, включая гистоновые киназы (histone kinase) и протеин-серин киназы (protein serine kinase). Дополнительные функции, выявленные анализом, включают регуляцию ферментативной активности, каталитическую активность и связывание с шаперонами, что указывает на многогранную роль *BIRC5* в регуляции клеточных процессов.

В совокупности результаты анализа молекулярных функций демонстрируют различия в механизмах действия *PMAIP1* и *BIRC5*. *PMAIP1* преимущественно вовлечен в формирование белковых комплексов и регуляцию сигнальных путей

на ранних этапах, в то время как *BIRC5*, посредством киназной активности и ингибирования протеаз, регулирует клеточные процессы на более поздних этапах, оказывая влияние на активность ферментов и контролируя протекание апоптоза. Различия в молекулярных функциях отражают их специфические и взаимодополняющие роли в регуляции клеточного цикла и гомеостаза.

В целях выявления биологических путей, статистически значимо обогащенных среди дифференциально экспрессируемых генов, был применен анализ путей KEGG с использованием базы данных ShinyGO версии 0.82.

Рисунок 39 представляет схематическое изображение сигнальных путей, ассоциированных с геном *PMAIP1*.

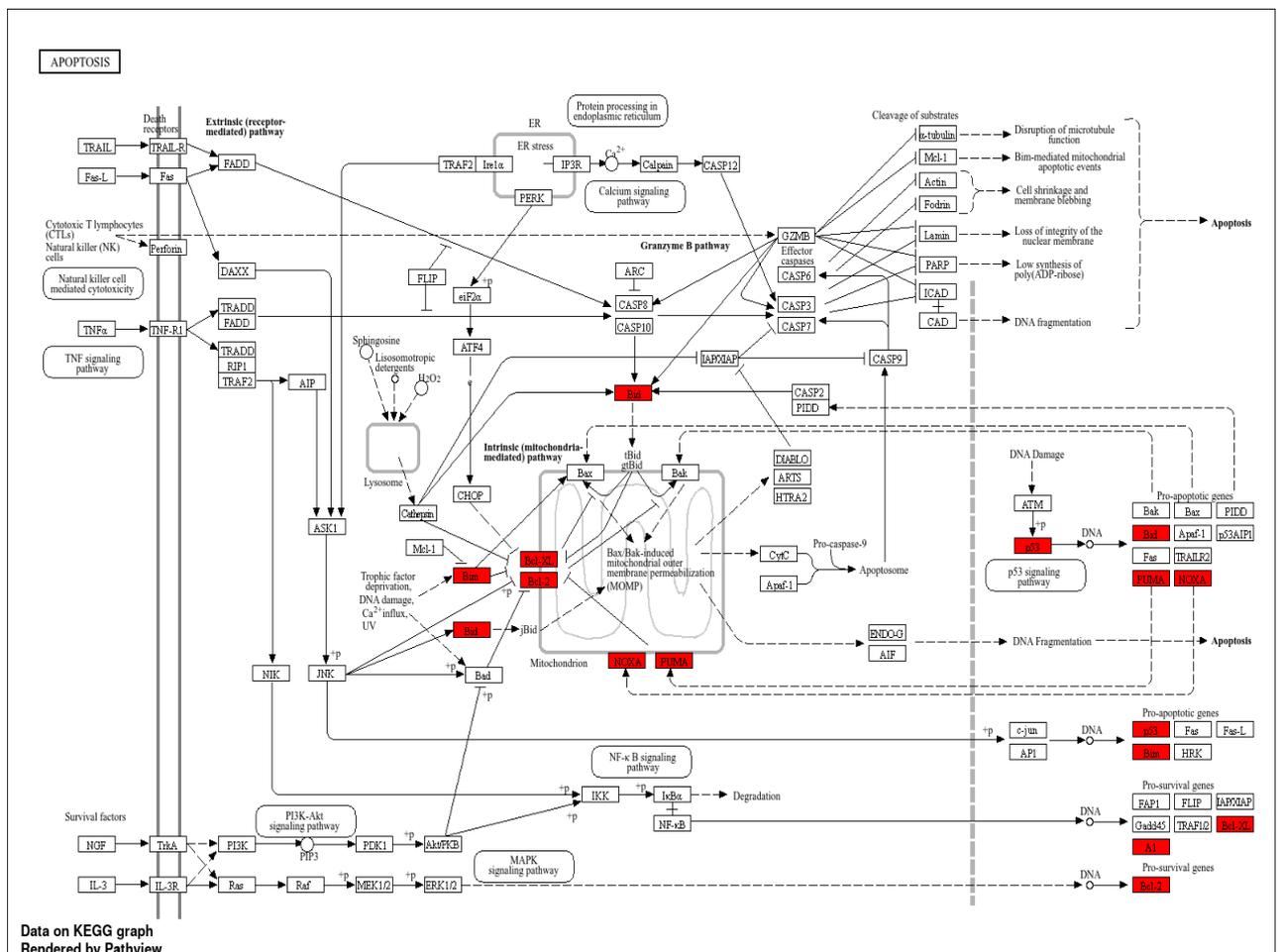


Рисунок 39 – Анализ сигнальных путей, связанных с *PMAIP1*

Видно, что индукция апоптоза белком *PMAIP1* запускается преимущественно p53-зависимым путем, активируемым в ответ на повреждение

ДНК или другие воздействия. ДНК-повреждающие агенты, такие как ионизирующее излучение или химиотерапевтические препараты, приводят к активации АТМ-киназы, которая, в свою очередь, фосфорилирует и стабилизирует транскрипционный фактор p53, который связывается с промоторной областью гена *PMAIP1*, стимулируя его транскрипцию и последующую трансляцию.

Белок Noxa играет ключевую роль в активации митохондриального пути апоптоза. Его функция заключается в непосредственном связывании с антиапоптотическими белками Bcl-2, что приводит к нейтрализации их ингибирующей активности. Это взаимодействие вызывает дисбаланс в соотношении про- и антиапоптотических белков Bcl-2, смещая его в пользу проапоптотических членов (Bax и Bak). В результате происходит олигомеризация Bax/Bak на внешней митохондриальной мембране, что способствует формированию трансмембранных пор. В результате потеря целостности внешней митохондриальной мембраны вызывает высвобождение проапоптотических факторов, таких как цитохром C, DIABLO и AIF, из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль. Цитохром C, в комплексе с Araf-1 и прокаспазой-9, формирует апоптосому, инициирующую каспазный каскад, кульминацией которого является активация эффекторных каспаз (Casp3, Casp7) и последующая деградация клеточных компонентов, характерная для апоптоза.

Рисунок 40 демонстрирует результаты анализа сигнальных путей, вовлекающих ген *BIRC5*.

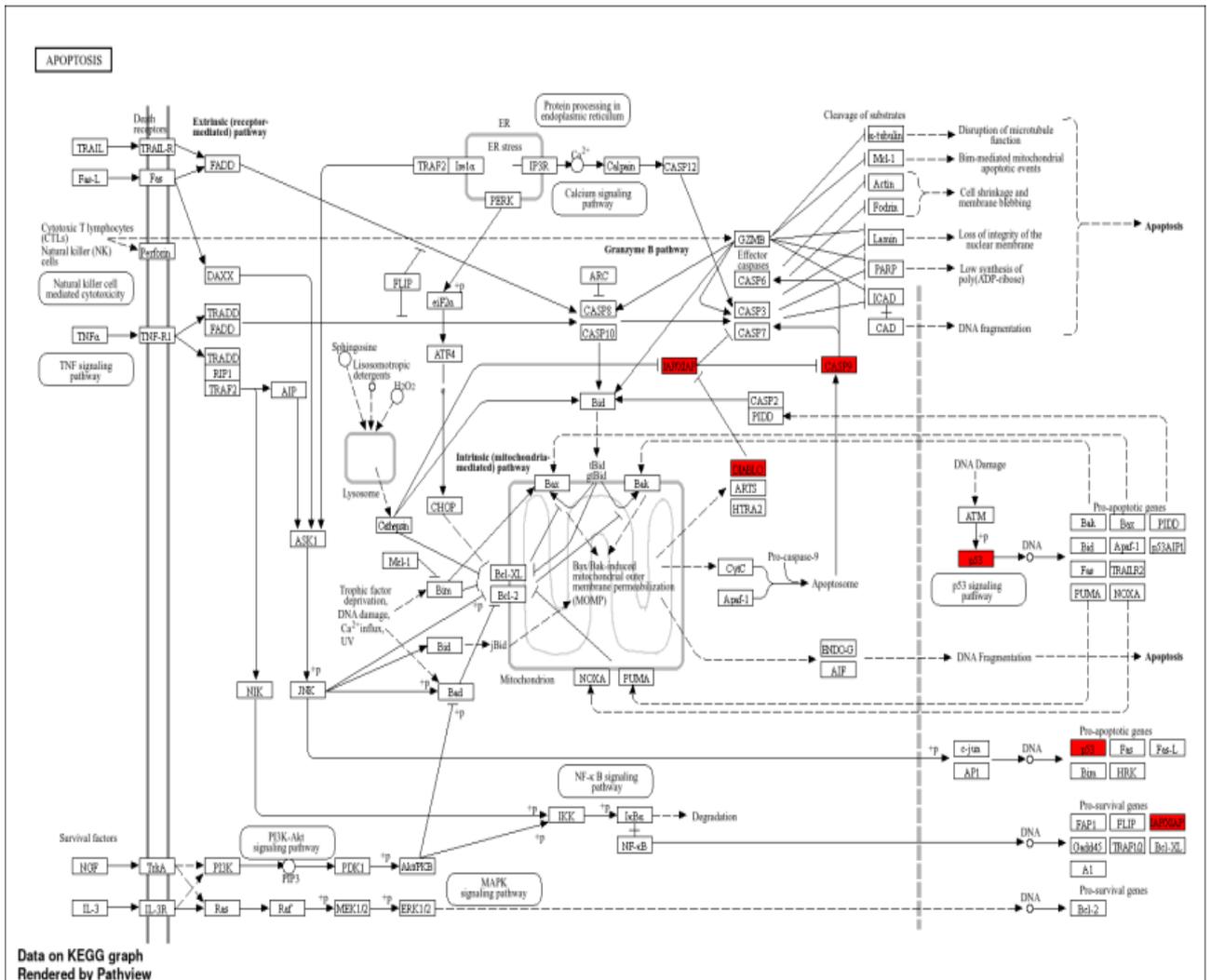


Рисунок 40 – Анализ сигнальных путей, связанных с *BIRC5*

Согласно представленным данным, *BIRC5* преимущественно подавляет активность эффекторных каспаз Casp3, Casp7 и Casp9. Это предотвращает каскад апоптотических событий, включая фрагментацию ДНК и образование апоптотических телец, тем самым способствуя выживанию клетки. Высокая экспрессия *BIRC5* часто наблюдается в опухолевых клетках, что объясняет их повышенную устойчивость к апоптозу, индуцированному химиотерапией или другими терапевтическими воздействиями. *BIRC5* функционирует в контексте других сигнальных путей, регулирующих апоптоз, включая p53-зависимый путь (где p53 активирует транскрипцию проапоптотических генов, таких как Bax и Puma) и пути, регулируемые факторами выживания (например, PI3K/Akt/NF-κB

путь). *BIRC5* может взаимодействовать с белками этих путей, чтобы модулировать клеточный ответ на апоптогенные стимулы.

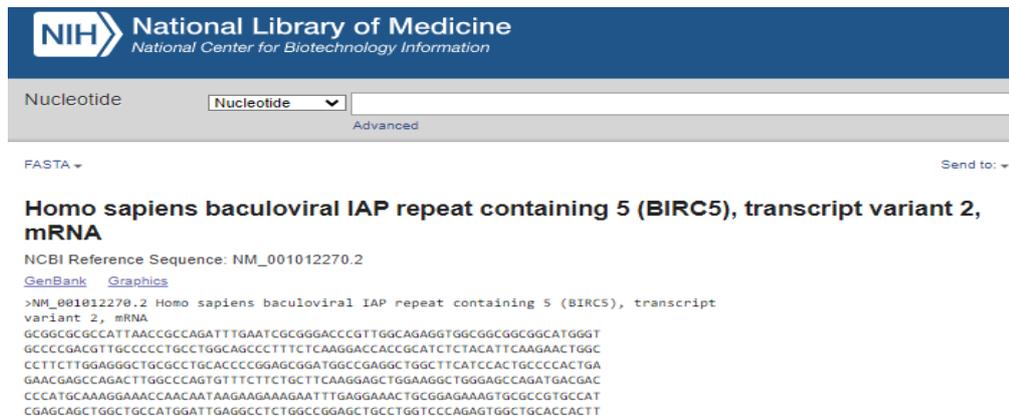
Таким образом, исходя из вышеизложенного, биоинформатический анализ, основанный на экспериментально подтвержденных взаимодействиях белков, выявил противоположные роли генов *PMAIP1* и *BIRC5* в регуляции клеточного цикла и гомеостаза. Исследование белковых взаимодействий продемонстрировало значимые ассоциации *BIRC5* с белками, вовлеченными в митотические процессы (*Med31*, *Aurka*, *Aurkb*, *Aurkc*, *Incenp*, *Cdca8*), и с модуляторами апоптоза (*Xiap*, *Casp9*, *Diablo*), включая TP53. Ранг взаимодействий подтвердил высокую значимость этих связей. *PMAIP1* продемонстрировал значимые взаимодействия с TP53 и множеством белков семейства Bcl-2, регулирующих апоптоз. Анализ GO подтвердил роль *PMAIP1* как ключевого регулятора митохондриально-зависимого апоптоза. Значительное обогащение терминов, связанных с высвобождением цитохрома C, изменениями митохондриальной морфологии и функцией, а также с внутренним и внешним апоптотическими путями, подтверждает его участие в индукции апоптоза. Его связь с TP53 усиливает его роль в реакции на клеточный стресс и повреждение ДНК. Анализ клеточных компонентов подтвердил митохондриальную локализацию *PMAIP1*. *BIRC5*, напротив, продемонстрировал сильную связь с регуляцией клеточного цикла и митоза. Анализ GO показал значительное обогащение терминов, относящихся к митотическому веретену и кинетохору. В совокупности с данными о киназной активности белка, эти результаты убедительно свидетельствуют о его вовлеченности в процессы формирования и функционирования митотического веретена, а также в обеспечение корректной сегрегации хромосом во время митоза. Анализ клеточных компонентов подтверждает локализацию в структурах, связанных с митозом. Его роль как ингибитора каспаз (*Casp3*, *Casp7*, *Casp9*) подтверждает его функцию в подавлении апоптоза.

Таким образом, данные биоинформатического анализа подтверждают взаимодополняющие и противоположные роли *PMAIP1* и *BIRC5* в регуляции клеточного цикла: *PMAIP1* действует как индуктор апоптоза, тогда как *BIRC5*

регулирует митоз и подавляет апоптоз, поддерживая клеточный гомеостаз. Полученные данные представляют собой необходимую основу для дальнейшего количественного анализа экспрессии генов, регулирующих апоптоз, и биоинформатического анализа, направленного на понимание регуляции этих процессов.

3.7 Результаты разработки праймеров для ПЦР-РВ

Начальным этапом при подготовке постановки полимеразной цепной реакции являлся подбор праймеров контрольному (ген «домашнего хозяйства») и целевому генам. В базе NCBI Nucleotide в формате FASTA находили последовательности мРНК исследуемых генов (рисунок 41).



The screenshot shows the NCBI Nucleotide search results page. At the top, there is a search bar with 'Nucleotide' selected and an 'Advanced' link. Below the search bar, the FASTA format is selected. The search results display the title 'Homo sapiens baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5), transcript variant 2, mRNA' and the NCBI Reference Sequence: NM_001012270.2. There are links for 'GenBank' and 'Graphics'. The main content is the FASTA sequence of the mRNA, which is a long string of nucleotide bases (A, C, G, T) with line breaks.

Рисунок 41 – Последовательность мРНК гена *BIRC5* в формате FASTA

Затем в формате FASTA базы данных NCBI находили соответствующую последовательность мРНК, после чего с помощью программы Primer-BLAST разрабатывали праймеры для этой последовательности (рисунок 42).

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

Primers for target on one template Primers common for a group of sequences

Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

PCR Template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)

Or, upload FASTA file

Range

Forward primer

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) Min Opt Max Max T_m difference

Exon/intron selection A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match Min 5' match Min 3' match Max 3' match

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min Max

Рисунок 42 – Разработка праймеров в программе Primer-BLAST

Оптимизация праймеров для данного исследования включала подбор олигонуклеотидных последовательностей, удовлетворяющих критериям специфичности и эффективности амплификации ДНК. Параметры праймерных последовательностей, определенные программой Primer BLAST [125], включая температуру плавления (T_m), длину, содержание GC и предсказанную специфичность, представлены на рисунке 43.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	T _m	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	Plus	22	920	941	60.92	54.55	4.00	2.00
Reverse primer	ACCACCCCTGTTCCTGTAGCCAA	Minus	22	1050	1029	64.41	54.55	4.00	4.00
Product length	131								

Рисунок 43 – Описание праймеров в базе данных Primer-BLAST для *GAPDH*

Рисунок 43 демонстрирует характеристики пары олигонуклеотидных праймеров, разработанных для амплификации фрагмента гена *GAPDH*. Праймеры обладают идентичной длиной (22 нуклеотида) и сходным содержанием GC-пар, что способствует одинаковой эффективности отжига. Разница температур плавления ($\Delta T_m = 3,49^\circ\text{C}$) находится в пределах, допускаемых для обеспечения специфичности амплификации. Низкий уровень самокомплементарности минимизирует риск образования неспецифических продуктов ПЦР. Все эти параметры свидетельствуют о соответствии праймеров принятым критериям

дизайна, обеспечивающим высокую эффективность и специфичность амплификации целевого фрагмента гена *GAPDH*. Отбор праймеров для амплификации остальных генов проводился по тем же критериям оптимизации.

Олигонуклеотидные последовательности, использованные в настоящем исследовании, были определены *in silico* с применением алгоритма Primer-BLAST, предназначенного для дизайна праймеров, соответствующим критериям, описанным в разделе 2.6.2. Полный список праймеров с указанием их нуклеотидных последовательностей и соответствующих целевых генов представлен в таблице 12.

Таблица 12 – Последовательности праймеров для оценки экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ

Ген	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (3'–5')
<i>BIRC5</i>	CCACTGAGAACGAGCCAGACTT	GTATTACAGGCGTAAGCCACCG
<i>GAPDH</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<i>PMAIP1</i>	CCAGCCGCCAGTCTAATCA	GTGCCCTTGGAAACGGAAGA

Таким образом, был обеспечен оптимальный выбор праймеров для дальнейшего экспериментального анализа.

3.8 Анализ экспрессии генов

На данном этапе эксперимента оценивалась экспрессия генов *BIRC5* и *PMAIP1*. Исследования выполнялись на клеточных линиях MCF-7 и SK-N-BE(2).

Выбор данных культур был обоснован ввиду их различной чувствительности к доксорубину и ионизирующему излучению, что было подтверждено предварительными экспериментами, включающими оценку клоногенной, пролиферативной и метаболической активностей. Экспериментальный дизайн предусматривал три группы исследования,

включающий облучение клеток протонами, ионами ^{12}C и γ -квантами. Каждая группа была разделена на четыре подгруппы: контрольную (без воздействия), обработанную доксорубицином, облучённую в дозе 4 Гр и подвергнутую комбинированному действию доксорубицина и ионизирующего излучения в дозе 4 Гр.

3.8.1 Анализ экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках MCF-7

На основании результатов анализа онтологии генов, было проведено исследование экспрессии целевых генов в клетках MCF-7. Рисунок 44 иллюстрирует изменения в экспрессии гена *BIRC5* в ответ на воздействия различными группами факторов.

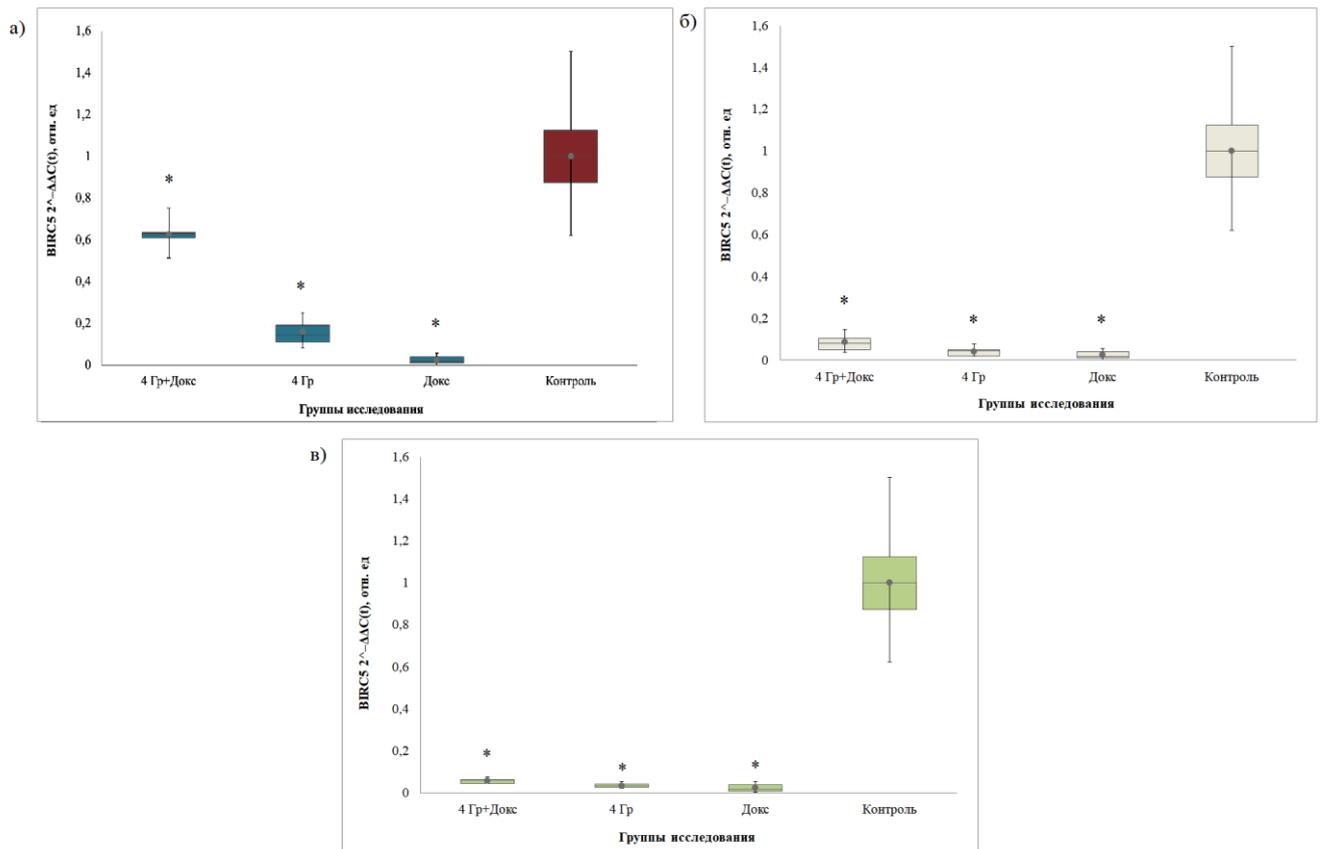


Рисунок 44 – Модуляция экспрессии гена *BIRC5* в клетках линии MCF-7 после воздействия протонов (а); γ -излучения (б); ионов ^{12}C (в)

Продемонстрировано, что контрольной группе наблюдался конститутивный уровень экспрессии *BIRC5* (1,00), характерный для многих опухолевых клеток, что подчеркивает их потенциал к выживанию и пролиферации.

Примечательно, что монотерапия доксорубицином приводила к значительному снижению экспрессии *BIRC5* до 0,02, что коррелирует с механизмом действия доксорубицина, направленным на индукцию апоптоза через подавление антиапоптотических факторов.

Установлено, что ионизирующее излучение оказывает статистически значимое ингибирующее действие на экспрессию антиапоптотического гена *BIRC5*, при этом для γ -излучения, протонов и ионов ^{12}C значения составили 0,04, 0,16 и 0,04 соответственно. Полученные данные согласуются с известной ролью *BIRC5* в индукции апоптоза.

Дальнейшие исследования продемонстрировали, что уровень экспрессии антиапоптотического гена лишь частично восстанавливался в условиях комбинированного действия химиопрепарата и γ -излучения (0,09), либо при воздействии ионов ^{12}C (0,04). Предполагается, что это связано с активацией компенсаторных механизмов, таких как сигнальные пути выживания (например, Akt/PI3K), усиление репарации ДНК или изменение экспрессии других антиапоптотических белков.

Особый интерес представляет наблюдение, что в результате комбинированного действия химиопрепарата и корпускулярного излучения (протонов) было зафиксировано существенное возрастание уровня экспрессии исследуемого гена (0,63). Этот показатель значительно превышал значения, наблюдаемые при монотерапии протонами (0,16). Такое наблюдение позволяет предположить активацию защитных путей клеточного выживания в ответ на комплексное цитотоксическое воздействие.

На рисунке 45 представлены уровни экспрессии гена *PMAIP1* после воздействия исследуемых групп факторов.

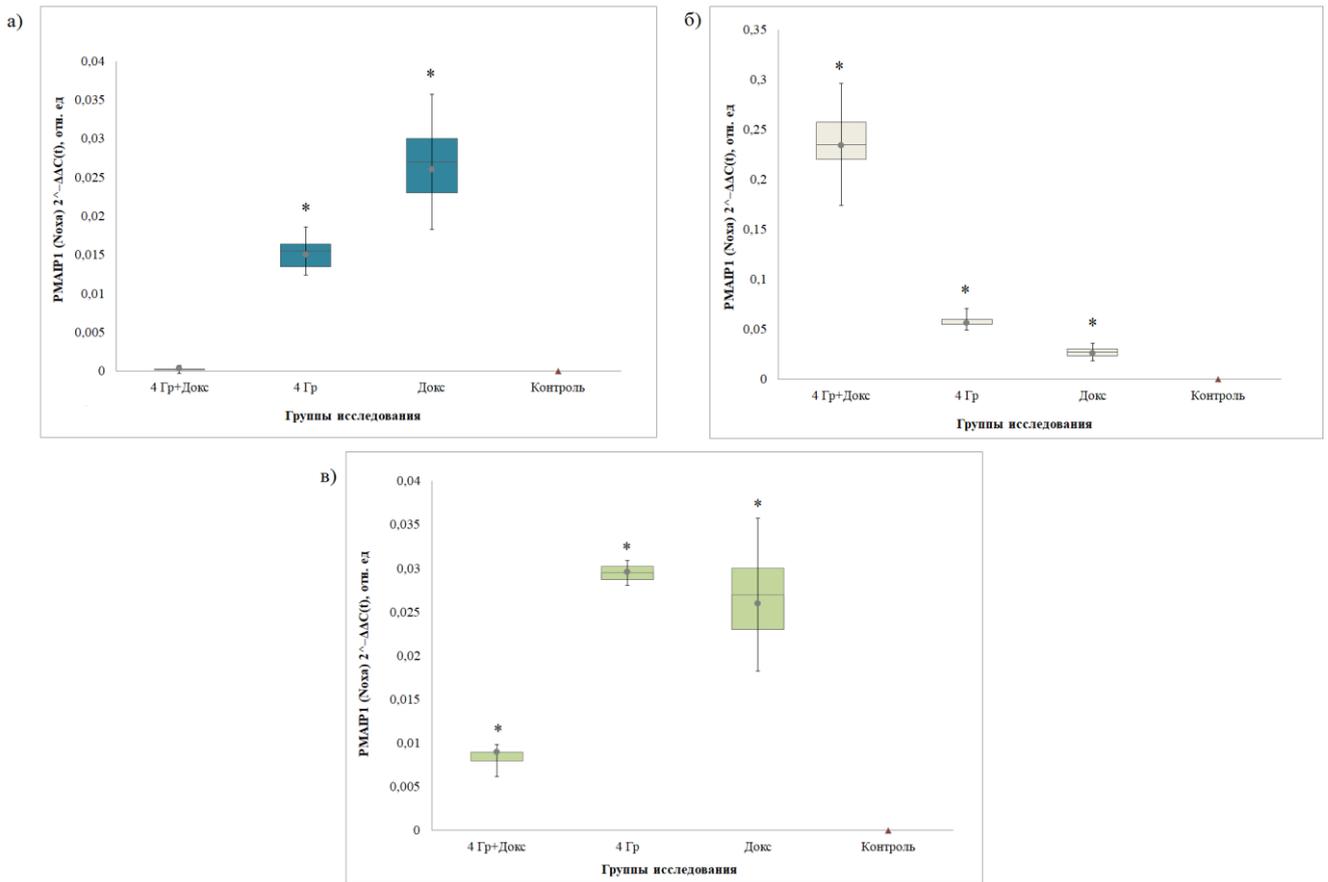


Рисунок 45 – Модуляция экспрессии гена *PMAIP1* в клетках линии MCF-7 после воздействия протонов (а); γ -излучения (б); ионов ^{12}C (в)

Анализ полученных экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что экспрессия проапоптотического гена проявляет гетерогенную динамику в ответ на различные терапевтические воздействия. В необработанных контрольных образцах экспрессия данного гена отсутствовала (0,00). Данный результат полностью согласуется с установленной ролью Noxa как ключевого медиатора программированной клеточной гибели, синтез мРНК которого обычно активируется в ответ на различные формы клеточного стресса [14].

В группе, подвергшейся воздействию исключительно доксорубина, было зафиксировано незначительное повышение экспрессии исследуемого гена (0,02). Это наблюдение коррелирует с молекулярным механизмом действия, который включает индукцию программированной клеточной гибели посредством инициации повреждений ДНК и последующей активации митохондриального сигнального пути апоптоза.

Экспериментально показано, что комбинированное действие доксорубицина и гамма-излучения демонстрирует значительный синергетический эффект, результатом которого является возрастание уровня транскрипции проапоптотического гена *PMAIP1*, достигающее показателя 0,20 [14].

Предположительно, механизм действия, ведущий к данному эффекту, включает кумулятивные повреждения ДНК, опосредованные обоими агентами. Это инициирует активацию сигнального каскада p53, который, в свою очередь, обеспечивает транскрипционную индукцию проапоптотического гена. Однако при анализе комбинированного действия химиопрепарата и тяжелых заряженных частиц (ионов ^{12}C) было выявлено минимальное увеличение экспрессии данного гена до 0,01. Особый интерес представляют данные об отсутствии значимого повышения экспрессии проапоптотического гена (0,0002) в ответ на комбинированное действие антибиотика доксорубицина и корпускулярного излучения (протонов). Было установлено, что облучение протонами, в отличие от прочих воздействий, способствовало повышению экспрессии гена *PMAIP1* до уровня 0,02 [14].

Представленные экспериментальные данные указывают на многофакторный характер регуляции апоптотических процессов в исследуемой клеточной линии. Все агенты ингибировали экспрессию *BIRC5*, причём наиболее выраженное подавление экспрессии наблюдалось при воздействии доксорубицина, что соответствует его известному цитотоксическому механизму. Наблюдаемые различия в степени подавления экспрессии *BIRC5* при воздействии различных типов излучения, по-видимому, связаны с особенностями механизмов повреждения ДНК и эффективностью функционирования путей репарации. Комбинированное воздействие протонов и доксорубицина ассоциировано с повышением уровня экспрессии *BIRC5*, что, вероятно, отражает активацию клеточных механизмов защиты в ответ на интенсивное комбинированное стрессовое воздействие. В целом, большинство использованных воздействий приводило к индукции экспрессии гена *PMAIP1*, причем наиболее выраженное повышение уровня экспрессии наблюдалось при совместном действии γ -

излучения и доксорубицина, что согласуется с гипотезой о синергическом характере их взаимодействия. Наблюдаемое снижение экспрессии гена *PMAIP1* при комбинированном действии доксорубицина и протонного излучения может объясняться несколькими факторами. Предполагается, что данный эффект является следствием усиления активности систем репарации ДНК, способных эффективно компенсировать индуцированные повреждения. Альтернативным объяснением может служить активация иных механизмов индукции клеточной гибели, функционирование которых не ассоциировано с регуляторной ролью гена *PMAIP1*.

Расчёт коэффициента кратности изменений (FC) экспрессии *BIRC5* и *PMAIP1* проводился по формуле 9. Кратные изменения, превышающие $|2|$, были признаны значимыми. Полученные результаты систематизированы в таблице 13.

Таблица 13 – Показатели коэффициента кратности изменений (FC) экспрессии *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках MCF-7

	Название гена	Контроль	Докс	Доза 4 Гр	Докс + 4 Гр
γ-излучение (источник ^{60}Co , излучения ^{60}Co , Еср = 1,25 МэВ)	<i>BIRC5</i>	1,00	-64,00*	-25,00*	-10,08*
	<i>PMAIP1</i>	0,0001	-40,32*	-16,00*	-5,04*
^{12}C (Еср = 455 МэВ/ нуклон)	<i>BIRC5</i>	1,00	-64,00*	-25,40*	-16,00*
	<i>PMAIP1</i>	0,0001	-40,32*	-32,00*	-80,63*
Протоны (энергия протонов 100 МэВ)	<i>BIRC5</i>	1,00	-64,00*	-6,35*	- 1,59
	<i>PMAIP1</i>	0,0001	-40,32*	-64,00*	-4096,00*

Примечание – Значимые отличия от контроля выделены жирным шрифтом, * – отличие значимо при $FC \geq |2|$

Согласно полученным данным, выявлено, что доксорубин вызывает существенное снижение экспрессии *BIRC5* ($FC = -64,00$), что согласуется с его

известной ролью ингибитора апоптоза. В свою очередь, доксорубицин вызывает снижение экспрессии *PMAIP1* (FC = -40,32). Учитывая, что Noxa – это проапоптотический белок, а доксорубицин – известный индуктор апоптоза, можно предположить, что в данном случае доксорубицин воздействует на другие, более значимые в данном контексте, пути индукции апоптоза.

Облучение клеток протонами привело к подавлению экспрессии антиапоптотического гена (FC = -6,35), при этом данный эффект оказался менее значительным, чем тот, что связан с химиопрепаратом. В результате комбинированного действия антибиотика антрациклинового ряда и протонов было зафиксировано незначительное снижение экспрессии антиапоптотического гена *BIRC5* (FC = -1,59). Параллельно было отмечено, что экспрессия проапоптотического гена демонстрировала более выраженное снижение (FC = -64,00), что, возможно, свидетельствует об интенсивности воздействия и активации адаптивных клеточных реакций. Резкое подавление экспрессии проапоптотического гена *PMAIP1* (FC = -4096,00) зафиксировано при комбинированном действии химиопрепарата доксорубицина и протонного излучения. Данный результат свидетельствует об активации механизмов, подавляющих запрограммированную клеточную гибель, что фактически приводит к полному прекращению транскрипции данного гена.

Облучение клеток MCF-7 γ -излучением в дозе 4 Гр вызывало значительное снижение экспрессии *BIRC5* (FC = -25,00). Следует отметить, что уровень экспрессии гена-супрессора апоптоза снижался в меньшей степени (FC = -10,08) при комбинированном действии гамма-излучения и химиопрепарата. Полученные результаты дают основания полагать, что химиопрепарат оказывает частичное антагонистическое действие по отношению к некоторым эффектам гамма-излучения, связанным с подавлением экспрессии гена *BIRC5*.

Представленные данные указывают на то, что как доксорубицин (FC = -64,00), так и облучение ионами ^{12}C (FC = -25,40) вызывают апоптоз в клеточной линии MCF-7, что подтверждается значительным снижением экспрессии *BIRC5*. В то время как оба типа воздействия оказывают влияние на экспрессию *PMAIP1*,

комбинированное действие доксорубина и ионов ^{12}C демонстрирует синергический эффект, характеризующийся особенно выраженным снижением уровня экспрессии *PMAIP1* ($\text{FC} = -80,63$), что может быть связано с активацией каскада апоптоза, в котором снижение экспрессии Noxa является одним из ключевых этапов. Таким образом, полученные результаты исследования на клеточной линии MCF-7 демонстрируют значительное изменение экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1*.

3.8.2 Анализ экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках SK-N-BE(2)

Руководствуясь данными анализа онтологии генов, была изучена экспрессия целевых генов в клетках нейробластомы линии SK-N-BE(2). На рисунке 46 представлены уровни экспрессии гена *BIRC5* после воздействия исследуемых факторов.

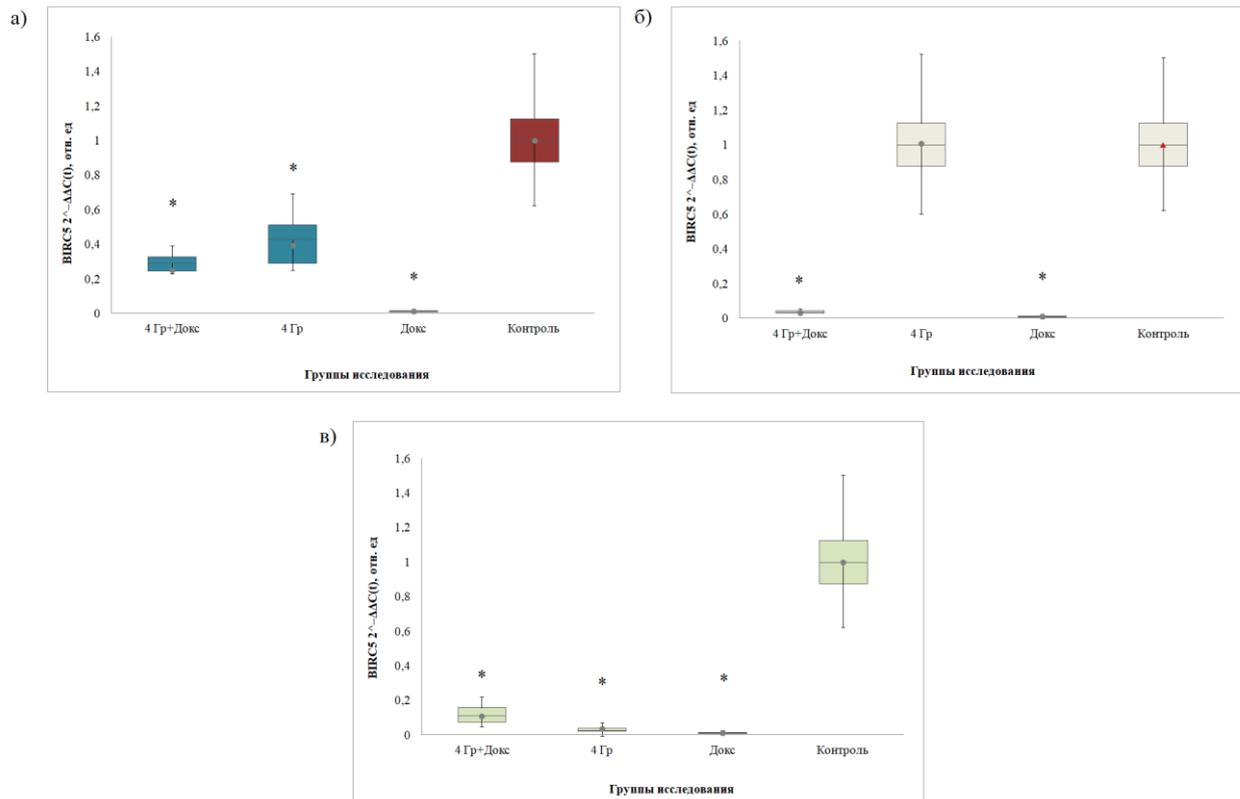


Рисунок 46 – Модуляция экспрессии гена *BIRC5* в клетках линии SK-N-BE(2) после воздействия протонов (а); γ -излучения (б); ионов ^{12}C (в)

Анализ данных выявил, что в клетках нейробластомы наблюдается выраженное снижение уровня экспрессии *BIRC5*, вызванное воздействием доксорубицина, с падением относительного показателя до 0,01. Данный эффект соответствует известному механизму действия препарата, включающему индукцию повреждений ДНК и последующую активацию апоптотического сигнального каскада. Полученные данные указывают на отсутствие статистически значимой модуляции экспрессии *BIRC5* под действием γ -излучения (1,00). Напротив, комбинированное действие γ -излучения и доксорубицина индуцировало заметное снижение экспрессии *BIRC5* (0,04). Данное наблюдение позволяет предположить синергизм в индукции клеточной гибели, опосредованный снижением уровня антиапоптотического фактора *BIRC5*. Облучение протонами в дозе 4 Гр вызывало снижение экспрессии *BIRC5* (0,40). Однако при комбинированном действии доксорубицина и протонов наблюдалось менее выраженное подавление экспрессии (0,25) в сравнении с эффектом, достигаемым доксорубицином. Облучение ионами ^{12}C демонстрировало выраженное снижение экспрессии *BIRC5* (0,02). Тем не менее, в случае комбинированного действия доксорубицина и ионов ^{12}C наблюдалось менее выраженное снижение экспрессии гена *BIRC5* (0,10).

Изменение экспрессии гена *PMAIP1* после воздействия применяемых агентов на клетки SK-N-BE(2) продемонстрировано на рисунке 47.

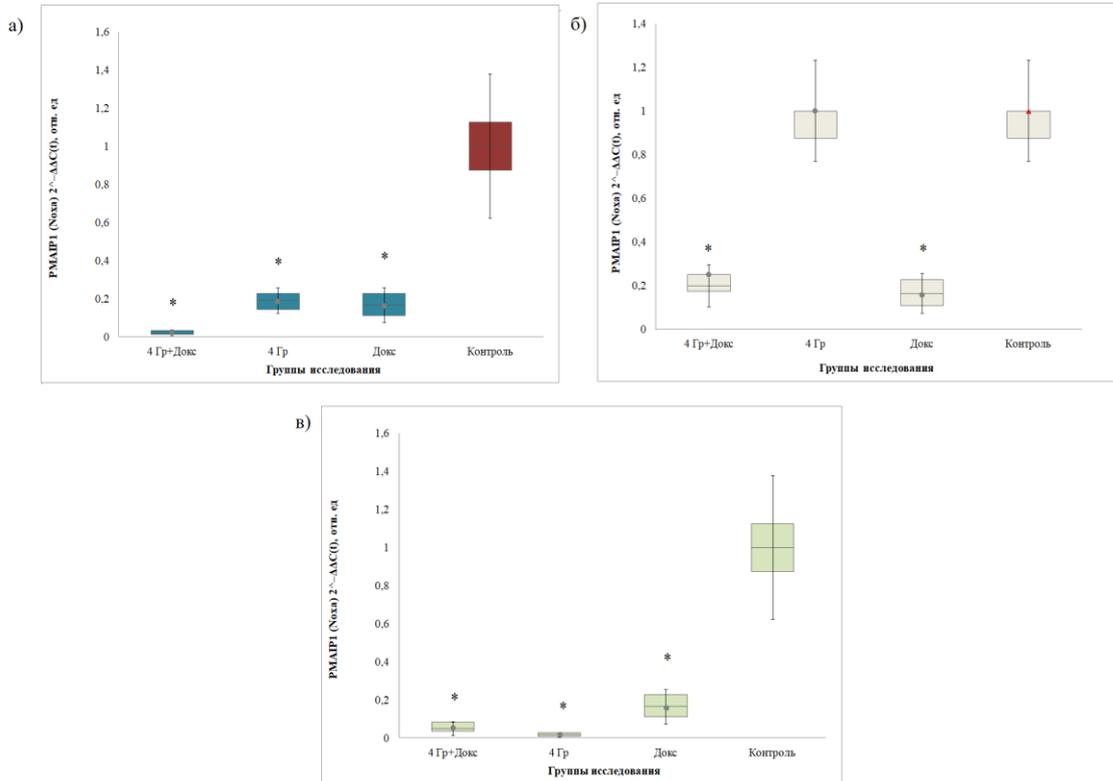


Рисунок 47 – Модуляция экспрессии гена *PMAIP1* в клетках линии SK-N-BE(2) после воздействия протонов (а); γ -излучения (б); ионов ^{12}C (в)

Продемонстрировано, что обработка клеток доксорубицином приводит к умеренному повышению уровня экспрессии анализируемого гена (0,16), что согласуется с известной способностью данного препарата индуцировать апоптоз.

Важно отметить, что комбинированное действие доксорубицина и γ -излучения демонстрирует синергическое усиление экспрессии *PMAIP1*, приводя к значительно более высокому уровню экспрессии (0,25) по сравнению с воздействием каждого агента по отдельности. Это позволяет предположить, что совместное применение данных агентов оказывает более выраженное влияние на запуск апоптотических механизмов посредством регуляции экспрессии гена *PMAIP1*. Существенное подавление экспрессии проапоптотического гена было обнаружено при действии химиопрепарата и корпускулярного излучения. Так, для протонов этот показатель составил 0,02, а для ионов ^{12}C – 0,05.

Таким образом, резюмируя вышесказанное, химиопрепарат доксорубицин, как и ожидалось, вызвал значительное снижение экспрессии антиапоптотического гена *BIRC5*, подтверждая его роль в индукции апоптоза. Тогда как γ -излучение не

оказывало значительного влияния на *BIRC5* в монотерапии, но в комбинации с доксорубицином наблюдался синергический эффект. Излучение с высокой ЛПЭ также снижало экспрессию *BIRC5*, однако в комбинации с доксорубицином это снижение было менее выражено, что указывает на активацию механизмов репарации ДНК. Наблюдаемые данные свидетельствуют о том, что антибиотик антрациклинового ряда способен активировать экспрессию проапоптотического гена. При этом эффект был значительно усилен при комбинированном действии химиопрепарата и гамма-излучения, что указывает на синергическую природу их взаимодействия. В противоположность ранее описанным режимам, комбинированное действие противоопухолевого агента и корпускулярного излучения привело к выраженному ингибированию экспрессии гена *PMAIP1*.

Затем согласно формуле 9 был рассчитан коэффициент кратности изменений (FC) экспрессии *BIRC5* и *PMAIP1*, результаты которого представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Показатели коэффициента кратности изменений (FC) экспрессии *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках нейробластомы линии SK-N-BE(2)

	Название гена	Контроль	Докс	Доза 4 Гр	Докс + 4 Гр
γ-излучение (источник ^{60}Co , излучения ^{60}Co , Еср = 1,25 МэВ)	<i>BIRC5</i>	1,00	-101,59*	-1,00	-25,40*
	<i>PMAIP1</i>	1,00	-6,35*	-16,00*	-4,00*
^{12}C (Еср = 455 МэВ/ нуклон)	<i>BIRC5</i>	1,00	-101,59*	-25,40*	-10,08*
	<i>PMAIP1</i>	1,00	-6,35*	-64,00*	-20,16*
Протоны (энергия протонов 100 МэВ)	<i>BIRC5</i>	1,00	-101,59*	-2,52*	-4,00*
	<i>PMAIP1</i>	1,00	-6,35*	-64,00*	-6,35*

Примечание – Значимые отличия от контроля выделены жирным шрифтом, * – отличие значимо при $FC \geq |2|$

Результаты демонстрируют значительное снижение экспрессии генов *BIRC5* (FC = -101,59) и *PMAIP1* (FC = -6,35) в ответ на воздействие доксорубицина. Подавление экспрессии *BIRC5*, гена, кодирующего антиапоптотический белок Survivin, прямо свидетельствует об интенсификации проапоптотических процессов. Этот факт согласуется с наблюдаемым увеличением клеточной гибели. Подавление экспрессии проапоптотического гена предположительно является следствием сложной многоуровневой регуляцией программированной клеточной гибели. Данная регуляция охватывает взаимодействие многочисленных сигнальных каскадов, которые совместно модулируют активность каспаз и прочих ключевых эффекторов апоптотической программы.

При комбинированном действии доксорубицина и γ -излучения наблюдается значимое, но менее выраженное, снижение экспрессии как *BIRC5* (FC = -25,0), так и *PMAIP1* (FC = -4,0) по сравнению с воздействием только доксорубицина. Эта разница в амплитуде эффекта свидетельствует о потенциальном антагонистическом взаимодействии между этими двумя агентами.

3.9 Корреляция между радиобиологическими эффектами и экспрессией генов

На данном этапе проведения исследования сравнивали результаты клоногенной, пролиферативной и метаболической активностей клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 и клеток нейробластомы линии SK-N-BE(2) с соответствующей кратностью изменения (FC) экспрессии исследуемых генов. Для оценки степени статистической связи были вычислены коэффициенты ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Коэффициенты корреляции Спирмена между радиобиологическими эффектами и экспрессией генов в клетках линии MCF-7

Вид излучения	Название гена		КА			t _{удв}			МТТ		
			ИИ	Докс	Докс+ИИ	ИИ	Докс	Докс+ИИ	ИИ	Докс	Докс+ИИ
γ-излучение	<i>BIRC5</i>	Спирман R	-0,447	0,459	0,918*	-0,103	-0,335	0,263	-0,447	-0,875	0,216
		p-value	0,450	0,437	0,028	0,870	0,581	0,669	0,450	0,052	0,727
	<i>PMAIP1</i> (Noxa)	Спирман R	0,295	0,053	-0,671	0,054	-0,872	-0,564	-0,825	-0,459	-0,527
		p-value	0,630	0,933	0,215	0,931	0,054	0,322	0,086	0,437	0,361
¹² C	<i>BIRC5</i>	Спирман R	0,000	0,000	0,526	0,000	0,803	0,574	-0,574	0,928**	0,526
		p-value	1,000	1,000	0,362	1,000	0,102	0,312	0,312	0,028	0,362
	<i>PMAIP1</i> (Noxa)	Спирман R	0,000	-0,707	0,000	0,000	0,803	0,000	-0,574	0,500	0,000
		p-value	1,000	0,182	1,000	1,000	0,102	1,000	0,312	0,391	1,000
Протоны	<i>BIRC5</i>	Спирман R	0,295	-0,500	-0,730	0,459	-0,825	0,000	0,412	0,574	-0,028
		p-value	0,630	0,391	0,161	0,437	0,086	1,000	0,490	0,312	0,965
	<i>PMAIP1</i> (Noxa)	Спирман R	-0,541	0,000	-0,921*	0,263	-0,295	-0,564	-0,649	-0,115	-0,649
		p-value	0,347	1,000	0,026	0,669	0,630	0,322	0,236	0,854	0,236

Примечание 1 – КА – клоногенная активность, t_{удв} – время удвоения (пролиферативная активность), МТТ – метаболическая активность.

Примечание 2 – * – корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя), ** – корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)

Результаты корреляционного анализа показывают сложные взаимосвязи между экспрессией генов *BIRC5* и *PMAIP1* и параметрами клеточной активности в клетках MCF-7 после воздействия ионизирующего излучения разного качества, доксорубицина или их комбинированного действия.

Наиболее значимая положительная корреляция обнаружена между экспрессией *BIRC5* и клоногенной активностью в группе с комбинированным действием доксорубицина и γ -излучения ($R = 0,918$, $p = 0,028$). Этот результат согласуется с установленной ролью *BIRC5* в подавлении апоптоза и, следовательно, повышении выживаемости клеток после повреждения ДНК [46].

Литературные данные подтверждают функциональную роль *BIRC5* в лекарственной устойчивости, демонстрируя, что снижение его экспрессии в модифицированных клетках MCF-7/Survivin увеличивает клеточное накопление доксорубицина, индуцируя апоптоз, что предполагает вовлечение сигнального пути PI3K/Akt/mTOR [46].

В то же время, в группе воздействия γ -излучения корреляции оказались статистически незначимыми ($R = -0,447$, $p = 0,450$), что указывает на сложность ответа клеток на отдельные терапевтические агенты.

Корреляция между экспрессией *BIRC5* и временем удвоения оказалась слабой и статистически незначимой в группах воздействия γ -излучения (воздействие γ -излучения: $R = -0,103$, $p = 0,870$; воздействие доксорубицина: $R = -0,335$, $p = 0,581$, комбинированное действие: $R = 0,263$, $p = 0,669$), что свидетельствует о незначительном влиянии *BIRC5* на скорость пролиферации клеток MCF-7 в данных условиях.

Вместе с тем, для остальных экспериментальных групп, включая те, что подвергались воздействию гамма-излучения как в случае с монотерапией ($R = -0,447$, $p = 0,450$), так и при комбинированном действии с химиопрепаратом ($R = 0,216$, $p = 0,727$) статистически значимые корреляционные зависимости не были обнаружены [14].

В отличие от *BIRC5*, проапоптотический ген *PMAIP1* показал обратную корреляцию с клеточными параметрами. Слабая отрицательная корреляция между

экспрессией Noxa и клоногенной активностью наблюдалась только в группе с комбинированным действием γ -излучения и доксорубицина ($R = -0,671$, $p = 0,215$).

Отсутствие значимых корреляций в других группах (воздействие γ -излучения: $R = 0,295$, $p = 0,630$; воздействие доксорубицина: $R = 0,053$, $p = 0,933$) предполагает сложное взаимодействие Noxa с факторами, определяющими выживаемость клеток при воздействии отдельных агентов.

Отрицательная корреляция, близкая к статистической значимости, между экспрессией Noxa и временем удвоения наблюдалась только в группе воздействия доксорубицина ($R = -0,872$, $p = 0,054$), что подтверждает участие Noxa в регуляции клеточной пролиферации.

В других группах корреляции были слабыми и статистически незначимыми (воздействие γ -излучения: $R = 0,054$, $p = 0,931$; комбинированное действие доксорубицина и γ -излучения: $R = -0,564$, $p = 0,322$).

Отрицательная корреляция, близкая к статистической значимости, между экспрессией Noxa и метаболической активностью выявлена только в группе воздействия γ -излучения ($R = -0,825$, $p = 0,086$), что может указывать на снижение метаболической активности в ответ на индукцию апоптоза, вызванную γ -излучением.

В экспериментальных группах, подвергшихся воздействию ионов ^{12}C , не было выявлено статистически значимой корреляции между уровнем экспрессии *BIRC5* и клоногенной активностью (облучение ионами ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$; воздействие доксорубицина: $R = 0,000$, $p = 1,000$; комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$). Этот результат противоречит ожиданиям, поскольку *BIRC5* обычно ассоциируется с выживаемостью клеток.

Аналогичная картина наблюдалась и для времени удвоения, где статистически незначимые корреляции обнаружены в группе, обработанной доксорубицином ($R = 0,803$, $p = 0,102$) и в группе комбинированного действия доксорубицина и ионов ^{12}C ($R = 0,574$, $p = 0,312$), в то время как в группе с облучением ионами ^{12}C корреляция отсутствовала ($R = 0,000$, $p = 1,000$). Это

указывает на то, что в контексте данного эксперимента изменение экспрессии *BIRC5* не оказывает значимого влияния на скорость пролиферации клеток MCF-7.

Статистически значимая положительная корреляция между экспрессией *BIRC5* и метаболической активностью обнаружена в группе воздействия доксорубицина ($R = 0,928$, $p = 0,028$). В остальных группах корреляции были слабыми и статистически незначимыми (облучение ионами ^{12}C : $R = -0,574$, $p = 0,312$; комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C : $R = 0,526$, $p = 0,362$).

В случае гена *PMAIP1*, корреляционные связи с клеточными параметрами также оказались слабыми и в основном статистически незначимыми. Отсутствие корреляции между экспрессией *PMAIP1* и клоногенной активностью наблюдалось в группах с облучением ионами ^{12}C и комбинированным действием (облучение ионами ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$; комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$).

Слабая отрицательная корреляция, не достигающая статистической значимости, наблюдалась лишь в группе воздействия доксорубицина ($R = -0,707$, $p = 0,182$), что может указывать на тенденцию к снижению клоногенной активности при повышенном уровне экспрессии *PMAIP1*.

Аналогично, отсутствовали корреляции между экспрессией *PMAIP1* и временем удвоения (облучение ионами ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$; комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$; воздействие доксорубицина: $R = 0,803$, $p = 0,102$).

В отношении метаболической активности корреляция отсутствовала в группах с облучением ионами ^{12}C и комбинированным действием (облучение ионами ^{12}C : $R = -0,574$, $p = 0,312$; комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C : $R = 0,000$, $p = 1,000$), а слабая положительная корреляция, не достигшая статистической значимости, наблюдалась только в группе воздействия доксорубицина ($R = 0,500$, $p = 0,391$).

В результате сравнения выживаемости в группе действия протонов по показателю клоногенной активности с соответствующей экспрессией гена *BIRC5*

корреляции наблюдались во всех группах: положительная ($R = 0,295$) в группе протонов, отрицательная ($R = -0,500$) в группе доксорубина, и более выраженная отрицательная ($R = -0,730$) в группе комбинированного действия. Однако ни одна из этих корреляций не является статистически значимой ($p > 0,05$).

При сравнении пролиферативной активности с соответствующей экспрессией гена *BIRC5* наблюдается как положительная ($R = 0,459$) так и отрицательная ($R = -0,825$) корреляции, но ни одна из них не достигает статистической значимости ($p > 0,05$).

При сравнении метаболической активности слабая положительная корреляция в группе протонов ($R = 0,412$), умеренная положительная в группе доксорубина ($R = 0,574$), но все корреляции статистически незначимы ($p > 0,05$).

Литературные данные демонстрируют разнонаправленное влияние компонентов сигнальных путей на экспрессию Survivin. Так, активация p38 (подгруппа MAPK) коррелирует со снижением уровня Survivin и апоптозом [53].

Исследования, проведенные на клетках рака предстательной железы, напротив, выявили, что функциональная активность JNK коррелирует с усиленной выживаемостью клеточных популяций и увеличением экспрессии сурвивина, что указывает на ее существенный вклад в онкогенез [76, 85].

Анализ литературных данных [117, 164] указывает на то, что экспрессия Survivin находится под контролем сигнального пути PI3K/AKT как в нормальных, так и в опухолевых клетках. Было продемонстрировано, что ингибирование PI3K на моделях рака молочной железы при взаимодействии с вогонином приводит к снижению экспрессии Survivin, индуцированию митотического ареста и уменьшению клоногенного потенциала [84]. В то время как влияние JAK/STAT-пути на экспрессию Survivin оказывается контекстно-зависимым: в некоторых типах опухолей его ингибирование снижает экспрессию Survivin [149], а в других – нет [161].

В свою очередь, в случае комбинированного действия химиопрепарата и протонного излучения зафиксирована выраженная отрицательная корреляция ($R = -0,921$, $p = 0,026$) между экспрессией гена-индуктора апоптоза и клоногенной активностью клеток аденокарциномы протоков молочной железы. В остальных группах корреляции слабые и статистически незначимые.

При сравнении анализа пролиферативной активности с соответствующей кратностью изменения экспрессии гена *PMAIP1* наблюдаются слабые корреляции, как положительная ($R = 0,263$) в группе протонов, так и отрицательная ($R = -0,295$) в группе доксорубицина, и более выраженная отрицательная ($R = -0,564$) в группе комбинированного действия. Однако все корреляции статистически незначимы ($p > 0,05$).

При сравнении метаболической активности с соответствующей кратностью изменения отрицательные корреляции наблюдаются в группе протонов ($R = -0,649$) и в группе комбинированного действия доксорубицина и протонов ($R = -0,649$). Однако все корреляции статистически незначимы ($p > 0,05$).

Анализ корреляционных данных свидетельствует о комплексной сети взаимодействий между уровнем экспрессии исследуемых генов. Было установлено, что прямая и статистически значимая зависимость между экспрессией антиапоптотического гена и клоногенной способностью клеток проявилась при комбинированном действии противоопухолевого антибиотика и гамма-излучения [14]. Данный вывод подтверждает установленную антиапоптотическую функцию этого гена.

Дополнительно, в группе, подвергнутой исключительно действию химиопрепарата, была выявлена статистически значимая положительная корреляция между уровнем экспрессии *BIRC5* и клеточным метаболизмом. В частности, только комбинированное действие доксорубицина и протонов показало тенденцию к отрицательной корреляции с клоногенностью, что соответствует проапоптотической роли данного гена.

В таблице 16 представлены результаты анализа коэффициентов ранговой корреляции Спирмена, которые были использованы для оценки взаимосвязей между радиобиологическими характеристиками клеток линии SK-N-BE(2) и уровнями экспрессии исследуемых генов.

Таблица 16 – Коэффициенты корреляции Спирмена между радиобиологическими эффектами и экспрессией генов в клетках линии SK-N-BE(2)

Вид излучения	Название гена		КА			t _{удв}			МТТ		
			ИИ	Докс	Докс+ИИ	ИИ	Докс	Докс+ИИ	ИИ	Докс	Докс+ИИ
γ-излучение	<i>BIRC5</i>	Спирман R	0,000	0,750	0,918**	0,000	0,250	0,970**	0,000	0,250	0,920**
		p-value	0,000	0,144	0,029	0,000	0,685	0,021	0,000	0,685	0,026
	<i>PMAIP1 (Noxa)</i>	Спирман R	0,000	0,500	0,918**	0,000	0,928**	0,960**	0,000	0,942**	0,922**
		p-value	0,000	0,391	0,028	0,000	0,028	0,031	0,000	0,049	0,026
¹²C	<i>BIRC5</i>	Спирман R	0,750	0,000	0,920**	0,574	0,363	0,918**	0,500	0,000	0,921**
		p-value	0,144	1,000	0,026	0,312	0,548	0,028	0,391	1,000	0,026
	<i>PMAIP1 (Noxa)</i>	Спирман R	0,500	0,500	0,922**	0,344	0,229	0,962**	0,921**	0,500	0,942**
		p-value	0,391	0,391	0,026	0,571	0,710	0,031	0,026	0,391	0,049
Протоны	<i>BIRC5</i>	Спирман R	0,600	0,825	0,921**	0,670	0,825	0,000	0,224	0,471	0,447
		p-value	0,285	0,086	0,026	0,219	0,086	1,000	0,718	0,423	0,450
	<i>PMAIP1 (Noxa)</i>	Спирман R	0,000	0,921**	0,895*	0,000	0,918**	0,684	0,750	0,500	0,444
		p-value	1,000	0,026	0,040	1,000	0,028	0,203	0,144	0,391	0,454

Примечание 1 – КА – клоногенная активность, t_{удв} – время удвоения (пролиферативная активность), МТТ – метаболическая активность.

Примечание 2 – * – корреляция значима на уровне 0,05 (двухсторонняя), ** – корреляция значима на уровне 0,01 (двухсторонняя)

Продемонстрировано, что корреляционный анализ показал тенденцию к положительной корреляции между уровнем экспрессии *BIRC5* и клоногенной активностью клеток при воздействии протонов ($R = 0,825$, $p = 0,086$). Кроме того, в условиях воздействия доксорубицина была выявлена тенденция к положительной корреляции между экспрессией антиапоптотического гена и временем удвоения клеточных популяций. Примечательно, что в ходе исследования была обнаружена статистически значимая прямая корреляция между клоногенным потенциалом клеток и транскрипционной активностью проапоптотического гена ($R = 0,921$, $p = 0,026$). Как было установлено, комбинированное действие химиопрепарата и протонного излучения приводило к появлению рассматриваемого эффекта. Кроме того, следует подчеркнуть, что экспрессия гена *PMAIP1* демонстрировала схожую прямую и статистически значимую корреляцию с клоногенностью. Действительно, эта взаимосвязь наблюдалась как при воздействии только доксорубицина ($R = 0,921$, $p = 0,026$), так и при его комбинированном действии с протонами ($R = 0,895$, $p = 0,040$). Аналогичная корреляция с параметром времени удвоения наблюдалась при воздействии доксорубицина ($R = 0,918$, $p = 0,028$). Статистически значимой корреляции между показателем метаболической активности и экспрессией *BIRC5* для клеток SK-N-BE(2) в группе воздействия протонов обнаружено не было.

Воздействие ионов ^{12}C показало слабые, не достигающие статистической значимости, положительные корреляции между экспрессией *BIRC5* и показателями клоногенной активности ($R = 0,750$, $p = 0,144$), временем удвоения ($R = 0,574$, $p = 0,312$) и метаболической активности ($R = 0,500$, $p = 0,391$). Доксорубицин не продемонстрировал значимых корреляций с экспрессией *BIRC5*.

Комбинированное действие доксорубицина и ионов ^{12}C выявило положительные корреляции с показателем клоногенной активности ($R = 0,920$, $p = 0,026$), времени удвоения ($R = 0,918$, $p = 0,028$) и метаболической активности ($R = 0,921$, $p = 0,026$).

Воздействие ионов ^{12}C показало значимую положительную корреляцию с метаболической активностью ($R = 0,921$, $p = 0,026$). Комбинированное действие

доксорубицина и ионов ^{12}C показало сильные положительные корреляции с клоногенной активностью ($R = 0,922$, $p = 0,026$), временем удвоения ($R = 0,962$, $p = 0,031$) и метаболической активностью ($R = 0,942$, $p = 0,049$).

Показано, что воздействие γ -излучения не выявило значимых корреляций между экспрессией *BIRC5*, *PMAIP1* и исследуемыми клеточными эффектами. Монотерапия доксорубицином показала тенденцию к слабой положительной корреляции между экспрессией *BIRC5* и клоногенной активностью ($R = 0,750$, $p = 0,144$), не достигшей статистической значимости, и умеренную положительную корреляцию между экспрессией *PMAIP1* и метаболической активностью ($R = 0,942$, $p = 0,049$).

Наиболее значимые результаты получены для комбинированного действия доксорубицина и γ -излучения. В этой группе обнаружены положительные корреляции между экспрессией *BIRC5* и всеми тремя параметрами: клоногенной активностью ($R = 0,918$, $p = 0,029$), временем удвоения ($R = 0,970$, $p = 0,021$) и метаболической активностью ($R = 0,920$, $p = 0,026$). Аналогично, экспрессия *PMAIP1* в комбинированной группе продемонстрировала сильные положительные корреляции с клоногенной активностью ($R = 0,918$, $p = 0,028$), временем удвоения ($R = 0,960$, $p = 0,031$) и метаболической активностью ($R = 0,922$, $p = 0,026$).

Таким образом, корреляционный анализ выявил зависимость между уровнем экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* и радиобиологическими показателями клеток нейробластомы SK-N-BE(2), зависящую от типа воздействия. Наиболее выраженные положительные корреляции обнаружены при комбинированном действии доксорубицина и γ -излучения, где экспрессия обоих генов положительно коррелировала с клоногенной активностью, временем удвоения и метаболической активностью. В то время как воздействие протонов и ионов ^{12}C , а также монотерапия доксорубицином демонстрировали менее выраженные и статистически менее значимые корреляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящего диссертационного исследования были изучены и обоснованы молекулярные механизмы, определяющие радиочувствительность опухолевых клеток. Использование синхротронного излучения для изучения взаимодействия тяжелых заряженных частиц с биологическими объектами на молекулярном и клеточном уровнях является необходимым условием для оптимизации и дальнейшего развития адронной терапии злокачественных новообразований.

Установлено, что корпускулярное излучение (ионы ^{12}C), характеризующееся высокой ЛПЭ, приводит к формированию кластеров повреждений ДНК, которые демонстрируют повышенную резистентность к репарации по сравнению с повреждениями, индуцированными излучением низкой ЛПЭ (γ -излучение). Кроме того, доксорубин, функционирующий как ингибитор топоизомеразы II, вызывает дополнительные повреждения ДНК, которые качественно отличаются от повреждений, индуцированных радиацией.

Выявленные различия в чувствительности к комбинированной терапии, выявленные в клеточных линиях MCF-7 и SK-N-BE(2), указывают на необходимость персонализированного подхода в онкологической практике. Такой подход подразумевает учет особенностей молекулярного профиля опухолевых клеток и типа используемого ионизирующего излучения. Результаты корреляционного анализа подтверждают эту концепцию. В частности, показано, что высокая экспрессия *BIRC5* в клетках MCF-7 ассоциирована с резистентностью к комбинированной терапии, в то время как высокая экспрессия *PMAIP1* коррелирует с её повышенной эффективностью. Ингибирующее действие доксорубина на пролиферацию клеток дополнительно подчеркивает сложность ответа опухоли на терапевтическое воздействие и необходимость учета множества молекулярных факторов при разработке эффективных терапевтических стратегий.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что чувствительность клеток линии MCF-7 достигает максимальной выраженности при комбинированном действии доксорубицина и корпускулярного излучения, что подтверждается как анализом метаболической активности, так и данными проточной цитометрии (снижение выживаемости клеток на 16,30% и 20,50% для протонов и ионов ^{12}C). Фибробласты линии hTERT наиболее чувствительны к корпускулярному излучению, по показателям пролиферативной и клоногенной активности. Для клеток линий HeLa и HUH-7 характерна умеренная чувствительность, проявляющаяся в сходном ответе при оценке клоногенной и пролиферативной активности. Резистентность клеток линии SK-N-BE(2) значимо выше как к действию γ -излучения, так и к корпускулярному излучению по показателям клоногенной и пролиферативной активности.

2. Продемонстрировано, что ОБЭ корпускулярного излучения ионов ^{12}C составила для MCF-7 – $2,07 \pm 0,07$, SK-N-BE(2) – $2,75 \pm 0,01$, HeLa – $1,81 \pm 0,13$, HUH-7 – $1,50 \pm 0,05$, hTERT – $2,90 \pm 0,12$, ОБЭ протонного излучения – MCF-7 – $1,59 \pm 0,09$, SK-N-BE(2) – $1,27 \pm 0,06$, HeLa – $1,01 \pm 0,05$, HUH-7 – $1,23 \pm 0,03$, hTERT – $2,56 \pm 0,49$.

3. Анализ онтологии генов продемонстрировал, что ген *PMAIP1* является ключевым регулятором митохондриально-зависимого апоптоза, а *BIRC5* играет центральную роль в процессах регуляции клеточного цикла и митоза.

4. Выявлено, что доксорубицин вызывает снижение уровня экспрессии гена *BIRC5* и увеличение *PMAIP1*. Действие ионизирующего излучения на клетки линии MCF-7 приводит к подавлению экспрессии гена *BIRC5*. Облучение клеток линии SK-N-BE(2) корпускулярным излучением приводит к снижению экспрессии *BIRC5*. В обеих линиях клеток наблюдается синергическое усиление экспрессии гена *PMAIP1* при комбинированном действии доксорубицина и γ -излучения.

5. Выявлена статистически значимая положительная корреляция между экспрессией гена *BIRC5* и клоногенностью в клетках MCF-7 при комбинированном действии доксорубицина и γ -излучения ($R = 0,918$, $p = 0,028$) и обратная корреляция между уровнем экспрессии гена *PMAIP1* и клоногенной активностью клеток после комбинированного действия доксорубицина и протонов ($R = -0,921$, $p = 0,026$). Установлена положительная корреляция между экспрессией *BIRC5* и метаболической активностью при воздействии доксорубицина ($R = 0,928$, $p = 0,028$).

6. Установлена прямая зависимость между уровнем экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках SK-N-BE(2) и клоногенной активностью при комбинированном действии доксорубицина и ионизирующего излучения (γ -излучения, ионов ^{12}C). Экспрессия гена *BIRC5* положительно коррелировала с эффектом комбинированного действия доксорубицина и ионов ^{12}C ($R = 0,920$, $p = 0,026$). Экспрессия гена *PMAIP1* демонстрировала положительную корреляцию с клоногенной ($R = 0,921$, $p = 0,026$), пролиферативной ($R = 0,928$, $p = 0,028$) и метаболической активностью ($R = 0,942$, $p = 0,049$) в группе воздействия доксорубицина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, М. Е. Доксорубицин: вклад в современную противоопухолевую терапию / М. Е. Абрамов, А. Ю. Машелуева, Е. И. Чичиков // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. – 2010. – № 3. – С. 46-49.
2. Бакина, О. В. Синергетический эффект противоопухолевой активности доксорубицина и бикомпонентных наноструктур на основе оксида алюминия / О. В. Бакина, Н. В. Сваровская, А. А. Миллер [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2020 – Т. 19, № 2 – С. 82-89.
3. Бекетов, Е. Е. Биологическая эффективность сканирующего пучка протонов терапевтического комплекса «Прометеус» МРНЦ им. А.Ф. Цыба в исследованиях на культуре клеток мышиной меланомы В-16 / Е. Е. Бекетов, Е. В. Исаева, Н. В. Наседкина [и др.] // Вопросы онкологии. – 2018. – Т. 64, № 5. – С. 678-682.
4. Бекетов, Е. Е. Равномерность биологической дозы в распределенном пике брэгга терапевтической установки со сканирующим пучком протонов / Е. Е. Бекетов, Е. В. Исаева, Н. В. Наседкина [и др.] // Вопросы онкологии. – 2019. – №4. – С. 532-536.
5. Белкина, С. В. Прогнозирование синергических эффектов ионизирующего излучения и других повреждающих факторов на клетки млекопитающих и растения / С. В. Белкина, Л. Н. Комарова, Р. О. Крицкий // Радиация и риск. – 2006. – Т. 15, № 3-4. – С. 120-132.
6. Епринцев, А. Т. Идентификация и исследование экспрессии генов: учеб.-метод. пособие / А.Т. Епринцев, В.Н. Попов, Д.Н. Федорин. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008. – 64 с.
7. Живодерников, И. В. Влияние доксорубицина на механизмы клеточной смерти синхронизированных культур раковых клеток / И. В. Живодерников, В. П. Свеколкин, Ю. В. Саенко // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2013. – №2. – С. 45-48.

8. Жураковская, Г. П. Принципы математического моделирования комбинированных действий в биологии и медицине / Г. П. Жураковская, В. Г. Петин // Радиация и риск. – 2015. – Т.24. – №1. – С. 61-73.

9. Ищенко, И. О. Совершенствование оценки противоопухолевого иммунитета с использованием метода проточной цитометрии / И. О. Ищенко, М. Д. Л. Оппедизано // *Forcipe*. – 2019. – Т. 2, № 4. – С. 24-31.

10. Каприн, А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова; под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025. – 275 с.

11. Комарова, Л. Н. Синергические эффекты комбинированного действия ионов углерода и химиопрепарата доксорубицин на раковых клетках линии HeLa / Л. Н. Комарова, А. А. Мельникова, Д. А. Балдов // Известия высших учебных заведений. Ядерная энергетика. – 2021. – № 3. – С. 158-168.

12. Конторщикова, К. Н. Влияние доксорубицина, озона и кислорода на жизнеспособность нормальных и злокачественных клеток печени в культуре / К. Н. Конторщикова, М. В. Ведунова, Е. С. Макарова [и др.] // Биорадикалы и Антиоксиданты. – 2016. – Т. 3, № 1.– С.15-17.

13. Лосев, Д. В. Аналитический расчет модифицированной кривой Брэгга: препринт НИИЯФ МГУ / Д. В. Лосев, М. Ф. Ломанов, А. П. Черняев. – М.: НИИЯФ МГУ, 2003. – 31 с.

14. Мельникова, А. А. Исследование комбинированного действия протонов и химиопрепарата доксорубицина на экспрессию генов BIRC5 (Survivin) и RMAIP1 (Noxa) в клетках линии MCF-7 / А. А. Мельникова, А. А. Афонин, Л. Н. Комарова [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 5-9.

15. Мельникова, А. А. Оценка эффективности комбинированного действия ионизирующего излучения разного качества и доксорубицина на клетки линии HeLa / А. А. Мельникова, Д. А. Балдов, А. Д. Соколова [и др.] // Радиация и

риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2025. – Т. 34, № 1. – С. 128-136.

16. Мельникова, А. А. Экспериментальное исследование биологического действия ионов ^{12}C и ^{60}Co на клетки гепатокарциномы / А. А. Мельникова, Д. А. Балдов, Л. Н. Комарова // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2023. – Т. 24, № 1. – С. 597-609.

17. Нейробластома: клинические рекомендации // Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2022. – URL: https://disuria.ru/_ld/13/1327_kr20C47C76MZ.pdf

18. О мерах по развитию синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры в Российской Федерации [Текст]: указ Президента РФ от 25.07.2019 № 356.

19. Об утверждении Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на период до 2030 года и дальнейшую перспективу [Текст]: постановление Правительства РФ от 16.03.2020 № 287.

20. Петин, В. Г. Значимость синергического взаимодействия ионизирующего излучения и других вредных факторов для усиления последствий чернобыльской аварии / В. Г. Петин, Л. Н. Комарова // Радиация и риск. – 2006. – Т. 15, № 1-2. – С. 85-113.

21. Петин, В. Г. Радиобиологические основы синергических взаимодействий в биосфере / В. Г. Петин, Г. П. Жураковская, Л. Н. Комарова. – М.: ГЕОС, 2012. – 219 с.

22. Петин, В. Г., Комаров В. П. Количественное описание модификации радиочувствительности / В. Г. Петин, В. П. Комаров. – М.: Энергоатомиздат, 1989. – 190 с.

23. Пятаев, Н. А. Особенности тканевого распределения и противоопухолевой активности доксорубицина при введении в форме конъюганта с ДНК у крыс с трансплантированной карциномой РС-1 / Н. А. Пятаев, С. А.

Щукин, Е. Ю. Коровина // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 55-61.

24. Рак молочной железы: клинические рекомендации // Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2021. – URL: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/02/rak-molochnoj-zhelezy-2021.pdf>

25. Рак печени (гепатоцеллюлярный): клинические рекомендации // Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2022. – URL: https://disuria.ru/_ld/13/1316_kr22C22p0MZ.pdf

26. Саенко, Ю. В. Фармакологическая коррекция оксидативного стресса, индуцированного доксорубицином, в почках крыс / Ю. В. Саенко, С. М. Напалкова, А. М. Шутов [и др.] // Нефрология. – 2005. – Т. 9, № 1. – С. 69-74.

27. Ткачев, С. И. Современные возможности лучевой терапии злокачественных опухолей / С. И. Ткачев, М. И. Нечушкин, Т. В. Юрьева // Вестник РАМН. – 2011. – № 12. – С. 34-40.

28. Трофимова, О. П. Прошлое и настоящее лучевой терапии в онкологии / О. П. Трофимова, С. И. Ткачев, Т. В. Юрьева // Клиническая онкогематология. – 2013. – № 4. – С. 355-364.

29. Фрешни, Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство: пер. с 6-го англ. изд. / Р. Я. Фрешни. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 791 с.

30. Хорошков, В. С. Физико-технические аспекты дистанционной лучевой терапии: от рентгена к адронам: учебное пособие / В. С. Хорошков, Г. И. Кленов. – М.: Физический факультет им. М.В. Ломоносова, 2018. – 104 с.

31. Черкасова, Е. И. Работа с культурами клеток: учебно-методическое пособие / Е. И. Черкасова, А. А. Брилкина. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета, 2015. – 57 с.

32. Ярмоненко, С. П. Радиобиология человека и животных: учебное пособие / С. П. Ярмоненко, А. А. Вайсон. – М.: Высшая школа, 2004. – 549 с.

33. Abdelrahman, E. J. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia / E. J. Abdelrahman, E. J. Sharples, M. C. McDonald [et al.] // Shock. – 2004. – Vol. 22, № 1. – P. 63-69.

34. Aggarwal, B. B. et al. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey / B. B. Aggarwal, S. C. Gupta, J. H. Kim // *Blood*. – 2012. – Vol. 119, № 3. – P. 651-665.
35. Ahmed, W. Role of human papillomavirus in various cancers: epidemiology, screening and prevention / W. Ahmed, S. Zaib, S. Ullah [et al.] // *Mini reviews in medicinal chemistry*. – 2023. – Vol. 23, № 10. – P. 1079-1089.
36. Armstrong, G. T. Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study / G.T. Armstrong, Q. Liu, Y. Yasui [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27, № 14. – P. 2328-2338.
37. Brumatti, G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals / G. Brumatti, M. Salmanidis, P.G. Ekert. // *Cellular and molecular life sciences*. – 2010. – Vol. 67, № 10. – P. 1619-1630.
38. Carmena, M. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis / M. Wheelock, H. Funabiki, W. C. Earnshaw // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2012. – Vol. 13, № 12. – P. 789-803.
39. Castell, J. V. Liver cell culture techniques / J. V. Castell, M. J. Gómez-Lechón // *Methods in molecular biology*. – 2009. – Vol. 481. – P. 35-46.
40. Cavalier, A. N. Accelerated aging of the brain transcriptome by the common chemotherapeutic doxorubicin / A. N. Cavalier, Z. S. Clayton, D. A. Hutton [et al.] // *Experimental gerontology*. – 2021. – Vol. 152. – P. 111451.
41. Chai, J. et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO / J. Chai, C. Du, J.W. Wu [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406, № 6798. – P. 855-862.
42. Chen, L. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function / L. Chen, S.N. Willis, A. Wei [et al.] // *Molecular cell*. – 2005. – Vol. 17, № 3 – P. 393-403.
43. Chipuk, J. E. The BCL-2 Family Reunion / J. E. Chipuk, T. Moldoveanu, F. Llambi [et al.] // *Molecular cell*. – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 299-310.

44. Dai, C. L. Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2 / C. L. Dai, Y. J. Liang, Y. S. Wang // *Cancer letters*. – 2009. – Vol. 279, № 1. – P. 74-83.
45. Delgado, Y. Apoptosis' Activation Associated to BH3 Only Domain and BCL-2 Homology Domain Proteins: New Way to Design Anti-Cancer Drugs / Y. Delgado, A. Torres, M. Milián // *Journal of cancer prevention and current research*. – 2019. – Vol. 10, № 3. – P. 54-59.
46. Deng, C. The establishment of quantitatively regulating expression cassette with sgRNA targeting *BIRC5* to elucidate the synergistic pathway of Survivin with P-glycoprotein in cancer multi-drug resistance / C. Deng, Hu F., Z. Zhao [et al.] // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2022. – Vol. 9. – P. 797005.
47. Denham, J. Canonical and extra-telomeric functions of telomerase: Implications for healthy ageing conferred by endurance training / J. Denham // *Aging cell*. – 2023. – Vol. 22, № 6. – P. e13836.
48. Douedi, S. Anthracycline Medications (Doxorubicin) [Электронный ресурс] / S. Douedi, M. P. Carson – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551633/> (дата обращения: 01.02.2024).
49. Du, C. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition / C. Du, M. Fang, Y. Li // *Cell*. – 2000. – Vol. 102, № 1. – P. 33-42.
50. Dumur, C. I. Genes involved in radiation therapy response in head and neck cancers / C. I. Dumur, A. C. Ladd, H. V. Wright [et al.] // *Laryngoscope*. – 2009. – Vol. 119, № 1. – P. 91-101.
51. Durante, M. Charged particles in radiation oncology / M. Durante, J. S. Loeffler // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 37-43.
52. Ediriweera, M. K. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery / M. K. Ediriweera, K. H. Tennekoon, S. R. Samarakoon // *Journal of applied toxicology*. – 2019. – Vol.39, № 1. – P. 38-71.

53. Espinosa, M. Survivin isoform Delta Ex3 regulates tumor spheroid formation / M. Espinosa, G. Ceballos-Cancino, R. Callaghan [et al.] // *Cancer letters*. – 2012. – Vol. 318, № 1. – P. 61-67.
54. Fang, X. L. Overview of role of survivin in cancer: expression, regulation, functions, and its potential as a therapeutic target / X. L. Fang, X. P. Cao, J. Xiao [et al.] // *Journal of drug targeting*. – 2024. – Vol. 32, № 3. – P. 223-240.
55. FASTA [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/332> (дата обращения: 14.12.2019)
56. Fei, P. P53 and radiation responses / P. Fei, W. S. El-Deiry // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22, № 37. – P. 5774-5783.
57. Feng, J. The RNA component of human telomerase / J. Feng, W. D. Funk, S. S. Wang [et al.] // *Science*. – 1995. – Vol. 269, № 5228. – P. 1236-1241.
58. Flow cytometry (FACS) staining protocol (Cell surface staining) // Yale School of Medicine - Yale Flow Cytometry. – URL: <https://research.yale.edu/documents/flow-cytometry-facs-surface-staining-analysis> (дата обращения: 10.05.2024).
59. Flusberg, D. A. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells / D. A. Flusberg, P. K. Sorger. // *Trends in cell biology*. – 2015. – Vol. 25, № 8. – P. 446-458.
60. Frassanito, M. A. Survivin overexpression in head and neck squamous cell carcinomas as a new therapeutic target (Review) / M. A. Frassanito, I. Saltarella, A. Vinella [et al.] // *Oncology reports*. – 2019. – Vol. 41, № 5. – P. 2615-2624.
61. Freed-Pastor, W. A. Mutant p53: one name, many proteins / W. A. Freed-Pastor, C. Prives // *Genes and development*. – 2012. – Vol. 26, № 12. – P. 1268-1286.
62. Galluzzi, L. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications / L. Galluzzi, M. C. Maiuri, I. Vitale [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2007. – Vol. 14, № 7. – P. 1237-1243.
63. Galluzzi, L. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 / L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2015. – Vol. 22, № 1. – P. 58-73.

64. Galluzzi, L. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control / L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer // *Microbial cell*. – 2016. – Vol. 3, № 3. – P. 101-108.
65. Galluzzi, L. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 486-541.
66. Galluzzi, L. Regulated cell death and adaptive stress responses / L. Galluzzi, J. M. Bravo-San Pedro, O. Kepp [et al.] // *Cellular and molecular life sciences*. – 2016. – Vol. 73, № 11-12 – P. 2405-2410.
67. Ghadimi, B. M. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy / B. M. Ghadimi, M. Grade, M. J. Difilippantonio [et al.] // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2005. – Vol. 23, № 9. – P. 1826-1838.
68. Gibert, B. Dependence receptors and cancer: addiction to trophic ligands / B. Gibert, P. Mehlen // *Cancer research*. – 2015. – Vol. 75, № 24. – P. 5171-5175.
69. Goldschneider, D. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy / D. Goldschneider, P. Mehlen // *Oncogene*. – 2010. – Vol. 29, № 13. – P. 1865-1882.
70. Greaves, G. BH3-Only Proteins Are Dispensable for Apoptosis Induced by Pharmacological Inhibition of Both MCL-1 and BCL-XL / G. Greaves, M. Milani, M. Butterworth [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2019. – Vol. 26, № 6. – P. 1037-1047.
71. Green, D. R. The clearance of dying cells: table for two / D. R. Green, T. H. Oguin, J. Martinez // *Cell death and differentiation*. – 2016. – Vol. 23, № 6. – P. 915-926.
72. Grégoire, V. General principles for prescribing, recording and reporting a therapeutic irradiation / V. Grégoire, R. Pötter, A. Wambersie // *Radiotherapy and oncology*. – 2004. – Vol. 73, № 2. – P. 57-61.

73. Guda, K. An improved method for staining cell colonies in clonogenic assays / K. Guda, L. Natale, S. Markowitz // *Cytotechnology*. – 2007. – Vol. 54, № 2. – P. 85-88.
74. Guha, M. Endogenous tumor suppression mediated by PTEN involves survivin gene silencing / M. Guha, J. Plescia, I. Leav [et al.] // *Cancer research*. – 2009. – Vol. 69, № 12. – P. 4954-4958.
75. Haettner, E. Experimental fragmentation studies with 12C therapy beams / E. Haettner, H. Iwase, D. Schardt [et al.] // *Radiation protection dosimetry*. – 2006. – Vol. 122, №. 14. – P. 485-487.
76. Haga, Y. Overexpression of c-Jun contributes to sorafenib resistance in human hepatoma cell lines / Y. Haga, T. Kanda, M. Nakamura [et al.] // *Plos one*. – 2017. – Vol. 12, № 3. – P. e0174153.
77. Hagenbuchner, J. The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression / J. Hagenbuchner, M. J. Ausserlechner, V. Porto [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2010. – Vol. 285, № 10. – P. 6904-6912.
78. Hall, E. J. *Radiobiology for the Radiologist* / E. J. Hall, A. J. Giaccia // Chapters 17, 27, 28. 8th ed. PA: Wolters Kluwer. – 2018. – 1162 p.
79. Hammond, E. M. ATR/ATM targets are phosphorylated by ATR in response to hypoxia and ATM in response to reoxygenation / E. M. Hammond, M. J. Dorie, A. J. Giaccia // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 14. – P. 12207-12213. doi: 10.1074/jbc.M212360200
80. Hardwick, J. M. Multiple functions of BCL-2 family proteins / J. M. Hardwick, L. Soane // *Cold spring harbor perspectives in biology*. – 2013. – Vol. 5, № 2. – P. a008722
81. Hassan, M. The BH3-Only Member Noxa Causes Apoptosis in Melanoma Cells by Multiple Pathways / M. Hassan, A. Alaoui, O. Feyen [et al.] // *Oncogene*. – 2008. – Vol. 27, № 33. – P. 4557-4568.

82. Hijikata, M. Molecular Cloning and Characterization of a CDNA for a Novel Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Responsive Gene That Is Highly Expressed in an Adult T-Cell Leukemia Cell Line / M. Hijikata, N. Kato, T. Sato [et al.] // *Journal of virology*. – 1990. – Vol. 64, № 10. – P. 4632-4639.

83. Huang, K. BH3-Only Proteins Target BCL-XL/MCL-1, Not BAX/BAK, to Initiate Apoptosis / K. Huang, K. L. O'Neill, J. Li [et al.] // *Cell research*. – 2019. – Vol.29, № 11. – P. 942-952.

84. Huang, K. F. Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway / K. F. Huang, G. D. Zhang, Y. Q. Huang [et al.] // *International immunopharmacology*. – 2012. – Vol. 12, № 2. – P. 334-341.

85. Huang, X. L. Activation of a c-Jun N-terminal kinase-mediated autophagy pathway attenuates the anticancer activity of gemcitabine in human bladder cancer cells / X. L. Huang, H. Zhang, X. Y. Yang [et al.] // *Anticancer drugs*. – 2017. – Vol. 28, № 6. – P. 596-602.

86. Ichim, G. Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death / G. Ichim, J. Lopez, S. U. Ahmed [et al.] // *Molecular cell*. – 2015. – Vol. 57, № 5 – P. 860-872.

87. Jie, M. M. Diverse regulatory manners of human telomerase reverse transcriptase / M. M. Jie, X. Chang, S. Zeng [et al.] // *Cell communication and signaling*. – 2019. – Vol. 17, № 1. – P. 63.

88. Johnson, D. Dose and linear energy transfer distributions of primary and secondary particles in carbon ion radiation therapy: A Monte Carlo simulation study in water / D. Johnson, Y. Chen, S. Ahmad // *Journal of medical physics*. – 2015. – Vol. 40, № 4. – P.214-219.

89. Jost, P. J. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis / P. J. Jost, S. Grabow, D. Gray [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 460, № 7258 – P. 1035-1039.

90. Julien, O. Caspases and their substrates / O. Julien, J. A. Wells // *Cell death and differentiation*. – 2017. – Vol. 24, № 8. – P. 1380-1389.

91. Kamińska, K. A Review on the Neurotoxic Effects of Doxorubicin / K. Kamińska, A. A. Cudnoch-Jędrzejewska // *Neurotoxicity research*. – 2023. – Vol. 41, № 5. – P. 383-397.
92. Keta, O. D. Comparison of human lung cancer cell radiosensitivity after irradiations with therapeutic protons and carbon ions / O. D. Keta, D. V. Todorović, T. M. Bulat [et al.] // *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.). – 2017. – Vol. 242, № 10. – P. 1015-1024.
93. Kim, H. CYR61 confers chemoresistance by upregulating survivin expression in triple-negative breast cancer / H. Kim, S. Son, Y. Ko [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2024. – Vol. 45, № 7. – P. 510-519.
94. Kotschy, A. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models / A. Kotschy, Z. Szlavik, J. Murray [et al.] // *Nature*. – 2016. – Vol. 538, № 7626. – P. 477-482.
95. Kroemer, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 / G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele // *Cell death and differentiation*. – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 3-11.
96. Kuchur, O. A. Transcriptional Reprogramming Regulates Tumor Cell Survival in Response to Ionizing Radiation: a Role of p53 / O. A. Kuchur, A. V. Zavisrskiy, A. A. Shtil // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2023. – Vol. 174, № 5. – P. 659-665.
97. Kumar, P. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay / P. Kumar, A. Nagarajan, P. D. Uchil // *Cold spring harbor protocols*. – 2018. – Vol. 6.
98. Lazar, A. A. Clinical trials involving carbon-ion radiation therapy and the path forward / A. A. Lazar, R. Schulte, B. Faddegon [et al.] // *Cancer*. – 2018. – Vol. 124, № 23. – P. 4467-4476.
99. Lee, K. B. Proton induces apoptosis of hypoxic tumor cells by the p53-dependent and p38/JNK MAPK signaling pathways / K. B. Lee, K. R. Kim, T. L. Huh [et al.] // *International journal of oncology*. – 2008. – Vol. 33, № 6. – P. 1247-1256.

100. Li, Y. Survivin as a biological biomarker for diagnosis and therapy / Y. Li, W. Lu, J. Yang // Expert opinion on biological therapy. – 2021. – Vol. 21, № 11. – P. 1429-1441.

101. Liang, J. MAFF confers vulnerability to cisplatin-based and ionizing radiation treatments by modulating ferroptosis and cell cycle progression in lung adenocarcinoma / J. Liang, G. Bi, Y. Huang [et al.] // Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. – 2024. – Vol. 73. – P. 101057.

102. Liu, C. The Cell Cycle G2/M Block Is an Indicator of Cellular Radiosensitivity / C. Liu, J. Nie, R. Wang [et al.] // Dose-response : a publication of International Hormesis Society. – 2019. – Vol. 17, № 4. – P. 155932581989100.

103. Liu, G. p21 stability: linking chaperones to a cell cycle checkpoint / G. Liu, G. Lozano // Cancer cell. – 2005. – Vol. 7, № 2. – P. 113-114.

104. Ma, S. Assembly of the Bak apoptotic pore: a critical role for the Bak protein alpha6 helix in the multimerization of homodimers during apoptosis / S. Ma, C. Hockings, K. Anwari [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2013. – Vol. 288, № 36. – P. 26027-26038.

105. Maeda, K. Evaluation of the relative biological effectiveness of spot-scanning proton irradiation in vitro / K. Maeda, H. Yasui, T. Matsuura [et al.] // Journal of radiation research. – 2016. – Vol. 57, № 3. – P. 307-311.

106. Martínez-García, D. Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer / D. Martínez-García, N. Manero-Rupérez, R. Quesada [et al.] // Medicinal research reviews. – 2019. – Vol. 39, № 3. – P. 887-909.

107. Matsumoto, Y. Enhanced radiobiological effects at the distal end of a clinical proton beam: in vitro study / Y. Matsumoto, T. Matsuura, M. Wada [et al.] // Journal of radiation research. – 2014. – Vol. 55, № 4. – P. 816-22.

108. Mehlen, P. Dependence receptors and colorectal cancer / P. Mehlen, S. Tauszig-Delamasure // Gut. – 2014. – Vol. 63, № 11. – P. 1821-1829.

109. Michaelidesová, A. Relative biological effectiveness in a proton spread-out Bragg peak formed by pencil beam scanning mode / A. Michaelidesová, J. Vachelová,

M. Puchalska [et al.] // Australasian physical and engineering sciences in medicine. – 2017. – Vol. 40, № 2. – P. 359-368.

110. Moldoveanu, T. Many players in BCL-2 family affairs / T. Moldoveanu, A. V. Follis, R. W. Kriwacki [et al.] // Trends in biochemical sciences. – 2014. – Vol. 39, № 3. – P. 101-111.

111. Nakamura, T. M. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human / T. M. Nakamura, G. B. Morin, K. B. Chapman [et al.] // Science. – 1997. – Vol. 277, № 5328. – P. 955-959.

112. NCBI [Электронный ресурс] – Режим доступа: ncbi.nlm.nih.gov (дата обращения: 14.12.2019).

113. Nicoletto, R. E. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells / R. E. Nicoletto, C. M. Ofner, 3rd. // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2022. – Vol. 89, № 3. – P. 285-311.

114. Nikjoo, H. Track structure in radiation biology: theory and applications / H. Nikjoo, S. Uehara, W. E. Wilson [et al.] // International Journal of Radiation Biology. – 1998. – Vol. 73, № 4. – P. 355-364.

115. Oda, E. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of P53-Induced Apoptosis / E. Oda, R. Ohki, H. Murasawa [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 288, № 5468. – P. 1053-1058-364.

116. Olivera, G. G. Pharmacogenetics in Neuroblastoma: What Can Already Be Clinically Implemented and What Is Coming Next? / G. G. Olivera, A. Urtasun, L. Sendra [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2021. – Vol. 22, № 18. – P. 9815.

117. Ou, DL. Vertical blockade of the IGFR- PI3K/Akt/mTOR pathway for the treatment of hepatocellular carcinoma: the role of surviving / D. L. Ou, B. S. Lee, L. I. Lin [et al.] // Molecular cancer. – 2014. – Vol. 13. – P. 2.

118. Ouellette, M. M The establishment of telomerase-immortalized cell lines representing human chromosome instability syndromes / M. M. Ouellette, L. D. McDaniel, W. E. Wright // Human molecular genetics. – 2000. – Vol. 9, № 3. – P. 403-411.

119. Paganetti, H. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy / H. Paganetti, A. Niemierko, M. Ancukiewicz [et al.] // *International journal of radiation oncology, biology, physics.* – 2002. – Vol. 53, № 2. – P. 407-421.
120. Park, J. I. Predictive DNA damage signaling for low-dose ionizing radiation / J. I. Park, S. Y. Jung, K. H. Song [et al.] // *International journal of molecular medicine.* – 2024. – Vol. 53, № 6. – P. 56.
121. Petin, V. G. Synergistic effects of different pollutants and equidosimetry / V. G. Petin, G. P. Zhurakovskaya, J. K. Kim // *Equidosimetry – Ecological Standardization and Equidosimetry for Radioecology and Environmental Ecology* /Eds.: F. Brechignac, G. Desmet. Dordrecht: Springer, 2005. – P. 207-222.
122. Pihan, P. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise / P. Pihán, A. Carreras-Sureda, C. Hetz // *Cell death and differentiation.* – 2017. – Vol. 24, № 9. – P. 1478-1487.
123. Ploner C., Kofler R., Villunger A. Noxa: At the Tip of the Balance between Life and Death / C. Ploner, R. Kofler, A. Villunger // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27, Suppl 1. – P. S84-S92.
124. Präbst, K. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin / K. Präbst, H. Engelhardt, S. Ringgeler [et al.] // *Methods in molecular biology.* – 2017. – Vol. 1601. – P. 1-17.
125. Primer BLAST [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 14.04.2022).
126. Prives, C. Cancer: Mutant p53 and chromatin regulation / C. Prives, S. W. Lowe // *Nature.* – 2015. – Vol. 525, № 7568. – P. 199-200.
127. Qin, J. Z. P53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas / J. Z. Qin, L. Stennett, P. Bacon [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics.* – 2004. – Vol. 3. – P. 895-902.
128. Rafatmanesh, A. The survivin molecule as a double-edged sword in cellular physiologic and pathologic conditions and its role as a potential biomarker and therapeutic target in cancer / A. Rafatmanesh, M. Behjati, N. Mobasseri [et al.] // *Journal of cellular physiology.* – 2020. – Vol. 235, № 2. – P. 725-744.

129. Reich, T. R. Localization matters: nuclear-trapped Survivin sensitizes glioblastoma cells to temozolomide by elevating cellular senescence and impairing homologous recombination / T. R. Reich, C. Schwarzenbach, J. B. Vilar [et al.] // Cellular and molecular life sciences. – 2021. – Vol. 78, № 14. – P. 5587-5604.

130. Ritner, C. Gene expression and early radiation response of two distinct neuroblastoma cell lines / C. Ritner, J. Popović, A. Abouzeid [et al.] // Oncology. – 2023. – Vol. 101, № 7. – P. 446-456.

131. Rogers, C. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death / C. Rogers, T. Fernandes-Alnemri, L. Mayes [et al.] // Nature communications. – 2017. – Vol. 8. – P. 14128.

132. Roufayel, R. Proteins Noxa and Puma are key regulators of induced apoptosis / R. Roufayel, K. Younes, A. Al-Sabi [et al.] // Life (Basel). – 2022. – Vol. 12, № 2. – P. 256.

133. Roufayel, R. Regulation of stressed-induced cell death by the Bcl-2 family of apoptotic proteins / R. Roufayel // Molecular Membrane Biology. – 2016. – Vol. 33, № 6-8. – P. 89-99.

134. Saha, M. N. RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of P53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses / M. N. Saha, H. Jiang, A. Mukai [et al.] // Molecular cancer therapeutics. – 2010. – Vol. 9, № 11. – P. 3041-3051.

135. Sarcadi, B. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System / B. Sarcadi, L. Homolya, G. Szakács [et al.] // Physiological reviews. – 2006. – Vol. 86, № 4. – P. 1179-1236.

136. Seo, Y. W. The Molecular Mechanism of Noxa-Induced Mitochondrial Dysfunction in P53-Mediated Cell Death / Y. W. Seo, J. N. Shin, K. H. Ko [et al.] // Journal of biological chemistry. – 2003. – Vol. 278, № 48. – P. 48292-48299.

137. Shalini, S. Old, new and emerging functions of caspases / S. Shalini, L. Dorstyn, S. Dawar [et al.] // Cell death and differentiation. – 2015. – Vol. 22, № 4. – P. 526-539.

138. Sigal, A. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome / A. Sigal, V. Rotter // *Cancer research*. – 2000. – Vol. 60, № 24. – P. 6788-6793.
139. Siragusa, G. Survivin (BIRC5): Implications in cancer therapy / G. Siragusa, L. Tomasello, C. Giordano [et al.] // *Life sciences*. – 2024. – Vol. 350. – P. 122788.
140. Sridharan, D. M. Understanding cancer development processes after HZE-particle exposure: roles of ROS, DNA damage repair and inflammation / D. M. Sridharan, A. Asaithamby, S. M. Bailey [et al.] // *Radiation research*. – 2015. – Vol. 183, № 1. – P. 1-26.
141. Steelman, L. S. Therapeutic resistance in breast cancer cells can result from deregulated EGFR signaling / L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. M. Akula [et al.] // *Advances in biological regulation*. – 2020. – Vol. 78. – P. 100758.
142. Strasser, A. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system / A. Strasser, P. J. Jost, S. Nagata // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30, № 2. – P. 180-192.
143. STRING [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://string-db.org/> (дата обращения: 20.10.2022).
144. Sucher, N. J. Searching for synergy in silico, in vitro and in vivo / N. J. Sucher // *Synergy*. – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 30-43.
145. Sun, G. A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death / G. Sun, E. Guzman, V. Balasanyan [et al.] // *The Journal of cell biology*. – 2017. – Vol. 216, № 10. – P. 3355-3368.
146. Szklarczyk, D. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest / D. Szklarczyk, R. Kirsch, M. Koutrouli [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2023. – Vol. 51, № D1. – P. D638-D646.
147. Tait, S. W. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond / S. W. Tait, D. R. Green // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2010. – Vol. 11, № 9. – P. 621-32.

148. Taylor, W. R. Regulation of the G2/M transition by p53 / W. R. Taylor, G. R. Stark // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20, № 15. – P. 1803-1815.

149. Tomita, M. Inhibition of constitutively active Jak-Stat pathway suppresses cell growth of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells / M. Tomita, H. Kawakami, J. N. Uchihara [et al.] // *Retrovirology*. – 2006. – Vol.3. – P. 22.

150. UniProt [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения: 20.10.2022).

151. Vanden Berghe, T. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features / T. Vanden Berghe, N. Vanlangenakker, E. Parthoens [et al.] // *Cell death and differentiation*. – 2010. – Vol. 17, № 6. – P. 922-930.

152. Wambersie, A. Isoeffective dose: a concept for biological weighting of absorbed dose in proton and heavier-ion therapies / A. Wambersie, H. G. Menzel, P. Andreo [et al.] // *Radiation protection dosimetry*. – 2011. – Vol. 143, № 2-4. – P. 481-486.

153. Wambersie, A. RBE, reference RBE and clinical RBE: applications of these concepts in hadron therapy / A. Wambersie // *Strahlentherapie und Onkologie*. – 1999. – Vol. 175, № 2. – P. 39-43.

154. Wambersie, A. The RBE issues in ion-beam therapy: conclusions of a joint IAEA/ICRU working group regarding quantities and units / A. Wambersie, J. H. Hendry, P. Andreo [et al.] // *Radiation protection dosimetry*. – 2006. – Vol. 112, № 1-4. – P. 463-470.

155. Wang, B. The p53 response element and transcriptional repression / B. Wang, Z. Xiao, H. L. Ko [et al.] // *Cell Cycle*. – 2010. – Vol. 9, № 5. – P. 870-879.

156. Wang, Z. Identification and characterization of two splicing variants of human Noxa / Z. Wang, Y. Sun // *Anticancer research*. – 2008. – Vol. 28, № 3A. – P. 1667-1674.

157. Warriar, N. M. Emerging importance of survivin in stem cells and cancer: the development of new cancer therapeutics / N. M. Warriar, P. Agarwal, P. Kumar // *Stem cell reviews and reports*. – 2020. – Vol. 16, № 5. – P. 828-852.

158. Wijaya, W. Extracellular Vesicle (EV) Survivin for Cancer Diagnostics and Therapeutics: A Review / W. Wijaya, S. M. Phyu, S. Jiang // *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. – 2024. – Vol. 29, № 8. – P. 302.

159. Wyllie, F. S. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts / F. S. Wyllie, C. J. Jones, J. W. Skinner [et al.] // *Nature genetics*. – 2000. – Vol. 24, № 1. – P. 16-17.

160. Xia, F. Mitosis-independent survivin gene expression in vivo and regulation by p53 / F. Xia, D. C. Altieri // *Cancer research*. – 2006. – Vol. 66, № 7. – P. 3392-3395.

161. Xiong, H. Inhibition of JAK1, 2/STAT3 signaling induces apoptosis, cell cycle arrest, and reduces tumor cell invasion in colorectal cancer cells / H. Xiong, Z. G. Zhang, X. Q. Tian [et al.] // *Neoplasia*. – 2008. – Vol. 10, № 3. – P. 287-297.

162. Zaru, R. UniProt Tools: BLAST, Align, Peptide Search, and ID Mapping / R. Zaru, S. Orchard, UniProt Consortium // *Current protocols*. – 2023. – Vol. 3, № 3. – P. e697.

163. Zembruski, N. C. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry / N. C. Zembruski, V. Stache, W. E. Haefeli [et al.] // *Analytical biochemistry*. – 2012. – Vol. 429, № 1. – P. 79-81.

164. Zhao, P. Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway / P. Zhao, Q. Meng, L. Z. Liu [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2010. – Vol. 395, № 2. – P. 219-224.

165. Zuckerman, V. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence / V. Zuckerman, K. Wolyniec, R.V. Sionov [et al.] // *Journal of pathology*. – 2009. – Vol. 219, № 1. – P. 3-15.