

На правах рукописи

ЦИШНАТТИ АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

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

Специальность: 1.5.1. Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2025

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна»

Научный руководитель

Гурьев Денис Владимирович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией радиационного канцерогенеза и токсикологии ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России

Официальные оппоненты

Максимов Георгий Владимирович – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биофизики (Биологический факультет) МГУ имени М. В. Ломоносова

Кошлань Игорь Владимирович – кандидат биологических наук, ученый секретарь Лаборатории радиационной биологии ОИЯИ, Дубна

Ведущая организация

Обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Коминант» Уральского отделения Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «11» декабря 2025 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 68.1.003.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» по адресу: 123098, г. Москва, ул. Живописная, 46. Тел.: +7 (495) 190-96-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» и на сайте организации: <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/dissertation-council>

Автореферат разослан «21» октября 2025 года

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Шандала Наталия Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на наметившийся прогресс в понимании механизмов возникновения злокачественных новообразований, диагностики и лечения, наблюдается рост заболеваемости, что делает это проблемой 21 века [Barker H., et al. 2015]. Как известно, лечение включает в себя лучевую терапию, хирургию, химиотерапию, иммунотерапию и гормональную терапию. Лучевая терапия (ЛТ) остается одним из основных видов лечения и составляет примерно 50%, что, в свою очередь, приводит к успеху в терапии лишь в 40% случаев [Baumann M., et al. 2008]. Основная цель лучевой терапии состоит в подавлении способности злокачественных новообразований к клеточному делению. Кроме классической радиотерапии, в последнее время широкое распространение получила стереотаксическая лучевая терапия [Timmerman RD., 2008], при которой используются одномоментно очень высокие дозы облучения для быстрой и точной элиминации опухолей в труднодоступных местах или возле жизненно важных органов. Особенностью этого вида терапии является короткий курс, когда пациент получает одну дозу облучения (радиохирургия) или несколько, не более пяти, фракций. Разовая очаговая доза (РОД) высока (десятки Гр) и может варьировать в широких пределах в зависимости от вида и локализации опухоли. Успех в радиотерапии определяется множеством факторов, среди которых одну из ключевых ролей играет резистентность опухолевых клеток к облучению в больших дозах. Именно поэтому разработка более эффективной стратегии лучевой терапии требует глубокого понимания молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе формирования устойчивости опухолевых клеток к воздействию ионизирующего излучения [McGranahan N., et al. 2017]. С момента открытия рентгеновских лучей были предприняты попытки получения радиорезистентных клеток путем использования ионизирующего излучения или мутагенов, однако согласованных механизмов клеточной радиорезистентности так и не было выявлено, что, по-видимому, связано с различиями изучаемых клеток по своему происхождению [Jeggo PA., et al. 2016].

Опухолевая ткань представляет собой набор гетерогенных клеток с различными генетическими и фенотипическими свойствами, которые определяют ее способность к развитию, метастазированию и устойчивости к лечению [Hanahan D., et al. 2011]. По этой причине сравнительные исследования эффектов радиационного воздействия на исходные клетки опухоли и на выжившие потомки этих клеток после острого облучения могут дать в дальнейшем возможность усовершенствовать протоколы лечения онкобольных [Gerlinger M., et al. 2012].

Ионизирующее излучение вызывает различные виды повреждений структуры ДНК. Поскольку двунитевые разрывы (ДР) ДНК считаются одними из наиболее критичных клеточных повреждений, индуцированных ионизирующим излучением, то последствиями их накопления может быть как клеточная гибель, так и последующие различные эпигенетические изменения [Helleday T., et al. 2008].

Корреляция между клеточной радиочувствительностью и эффективностью репарации ДР ДНК была изучена в различных линиях опухолевых клеток, однако связь между радиорезистентностью опухолевых клеток и способностью их к репарации ДНК все еще остается спорной [Willers H., et al. 2015]. Эти расхождения объясняются, с одной стороны, использованием различных методов определения клеточной радиорезистентности и, с другой, что сравнение проводится среди клеток с различными геномными профилями [Ko EC., et al. 2018].

Таким образом, для выяснения механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток человека к радиационному воздействию необходимо комплексно оценить и охарактеризовать молекулярно-клеточные изменения в популяции опухолевых

клеток, способных выживать после острого облучения в больших дозах [Ashworth A., et al. 2011].

Степень разработанности темы исследования

Вопросы радиорезистентности опухолей давно находятся в центре внимания мирового научного сообщества. Первые систематизированные представления о важности внутритканевой гетерогенности опухолей были предложены ещё в конце XX века трудами американских ученых, таких как [Fidler I.J., 1978]. Дальнейшее развитие эта идея получила в исследованиях британских и немецких коллективов [Gerlinger M., et al. 2012; Campbell L.L., et al. 2007; Shipitsin M., et al. 2007], которые показали важность внутриклеточной и тканевой неоднородности опухолей, приводящей к развитию радиорезистентности.

Особенное значение приобрело изучение молекулярных механизмов, вовлечённых в процессы восстановления поврежденной цепи ДНК, вызванной воздействием ионизирующего излучения. Исследования групп [Wu Y., et al. 2023; Li J. et al. 2019; Yang C.X. et al. 2013], демонстрируют, что репарация ДР ДНК играет ключевую роль в устойчивости опухолевых клеток к облучению.

Современный этап исследований характеризуется повышенным вниманием к роли экзосом (онкосом), участвующих в передаче сигналов между опухолевыми клетками и факторами микроокружения. Работы [Busson P., et al. 2016; Boelens M. C., et al. 2014; Mrowczynski O. D., et al. 2018] раскрывают потенциал экзосом в индукции радиорезистентности и поддержании жизнеспособности опухолевых клеток после облучения.

Кроме того, значительным достижением стало выявление участия определенных белков, таких как Cdc25c, в процессах, связанных с изменением клеточного цикла и повышением устойчивости опухолевых клеток к радиационному воздействию, что показано в работах китайских ученых [Li J. et al. 2019; Yang C.X. et al. 2013].

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

Ряд авторов подчеркивает ключевой вклад регуляторов транскрипционного фактора p53 в поддержании баланса между ростом клеток и развитием защитного стресса. Согласно работам [Chen J. 2016, 2012; Gatz S.A., Wiesmuller L., 2006; Tan T., Chu G., 2002; Halazonetis T.D., et al. 2008;] активация и стабилизация p53 приводят к запуску многочисленных эффекторных генов, таких как p21, BAX, Noxa, Puma, что усиливает запрограммированную гибель клеток и предотвращает образование канцерогенных мутаций.

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

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Получить выжившие опухолевые клетки человека линий A549 (карцинома легкого человека), HeLa (карцинома шейки матки) и H1299 (p53-дефицитные клетки немелкоклеточного рака легкого) после рентгеновского облучения в дозе 15 Гр;
2. Дать сравнительную оценку времени удвоения популяции выживших после облучения и исходных опухолевых клеток человека линий A549, H1299 и HeLa;
3. Дать сравнительную характеристику клеточной гибели и проанализировать изменения в клеточном цикле контрольных и выживших после облучения опухолевых клеток человека линий A549, H1299 и HeLa с последующим рентгеновским облучением в дозах 5 и 10 Гр;
4. Сравнить уровень остаточных фокусов репарации двунитевых разрывов ДНК и цитогенетических нарушений (микроядер) в контрольных и выживших после облучения опухолевых клетках человека линий A549, H1299 и HeLa с последующим рентгеновским облучением в дозах 5 и 10 Гр;
5. Изучить клоногенную и миграционную способности выживших и исходных опухолевых клеток человека линий A549, HeLa и H1299 после острого рентгеновского облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр.

Научная новизна

Впервые получены и охарактеризованы выжившие и активно пролиферирующие опухолевые клетки человека A549RR (исходная линия A549), HeLaRR (HeLa) и p53-дефицитные H1299RR (H1299) после острого воздействия рентгеновским излучением в дозе 15 Гр. Впервые проведены эксперименты с использованием широкого спектра молекулярно-генетических и цитологических методов для сравнительной оценки характеристик выживших после острого облучения опухолевых клеток трех линий с различными вариантами последующего радиационного воздействия. У выживших клеток была отмечена значительная пролиферативная задержка, выражавшаяся в увеличении времени удвоения популяции по сравнению с контрольными клетками без дополнительного облучения. Выявлена возможная причина этого эффекта, а именно увеличение времени удвоения популяции выживших клеток A549RR и H1299RR связано с высоким уровнем гибели этих клеток, у клеток HeLaRR, скорее всего, связано с увеличением времени прохождения стадий клеточного цикла. Данные получены на основании анализа клеточной гибели, распределения по стадиям клеточного цикла и экспрессии маркера клеточной пролиферации. В качестве маркера использовали иммуноцитохимически окрашиваемый белок Ki-67, который также позволил установить дозозависимое снижение пролиферативного потенциала клеток линии A549 и A549RR. Иммуноцитохимическим и цитогенетическим методами выявлено значительное снижение уровня как остаточных фокусов ДР ДНК, так и микроядер в выживших клетках A549RR и HeLaRR по сравнению с исходными клетками после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр.

Обнаружено, что выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки H1299RR имеют значительный процент гибели, как без облучения, так и через 24 часа после воздействия в дозах 5 и 10 Гр по сравнению с исходными клетками. Противоположная картина наблюдалась для линии A549: через сутки после дополнительного облучения в

тех же дозах процент гибели был существенно выше у исходных клеток, чем у A549RR. Гибель клеток HeLa и HeLaRR возрастала с увеличением дозы, однако статистически значимых различий между ними выявлено не было.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные имеют существенное значение для раскрытия процессов развития устойчивости клеток опухоли к воздействию ионизирующих излучений. Широко используемые в настоящее время методы стереотаксической лучевой терапии, где используются высокие дозы облучения за короткое время и малое количество фракций (до 5), а в радиохирургии однократное облучение, диктуют необходимость изучения формирующихся эффектов в опухолевых клетках при действии больших доз ионизирующего излучения. Особенно это касается вопросов радиоустойчивости, миграционной способности, выживаемости клеток опухоли. Анализ молекулярно-генетических и клеточных изменений, лежащих в основе формирования устойчивости к радиационному фактору, позволит оптимизировать текущие схемы терапии онкологических пациентов и снизить риск возникновения рецидивов. Значимость полученных результатов для клинической практики заключается в возможности подбора режимов облучения, тем самым повышая эффективность лечения. Эти данные также открывают перспективы для создания принципиально новых методов терапии, направленных на предотвращение рецидивов злокачественных новообразований, а также способствовать обнаружению перспективных лекарственных препаратов, которые смогут модифицировать радиорезистентность опухолевых клеток.

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

Методология и методы исследования

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

В работе применялись следующие методики: культивирование опухолевых клеток человека; иммуноцитохимическое окрашивание опухолевых клеток для количественной оценки остаточных фокусов ДР ДНК, а также их пролиферативной активности и определения стадий клеточного цикла; микроядерный тест для оценки цитогенетических нарушений; клоногенный тест для оценки репродуктивной гибели клеток; тест на заживление «раны» или «скрэтч-тест» для определения пролиферативной и миграционной активности опухолевых клеток. Полученные данные были обработаны с использованием различных статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. У выживших после острого облучения клеток карциномы легкого человека, карциномы шейки матки и р53-дефицитных клеток немелкоклеточного рака легкого значительно увеличивается время удвоения клеточной популяции за счет остановки в сверхочных точках клеточного цикла (линии A549 и HeLa) и гибели клеток (линия р53-дефицитных H1299).
2. Выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки HeLa, по сравнению с предварительно необлученными, имели значительно меньшее количество остаточных фокусов репарации ДР ДНК и количество микроядер как без дополнительного воздействия, так и после рентгеновского облучения в дозах 5 и 10 Гр. Аналогичные результаты получены для клеток A549, однако достоверно низкие показатели по количеству остаточных фокусов репарации ДР ДНК фиксировали после облучения в дозе 10 Гр.
3. Клоногенный тест выявил более высокую устойчивость выживших после острого облучения в дозе 15 Гр опухолевых клеток A549RR, HeLaRR и H1299RR к дополнительному воздействию рентгеновского излучения в дозах 2, 4 и 6 Гр. Наиболее высокую выживаемость отмечали у р53-дефицитных клеток H1299RR.
4. Выжившие после острого облучения в дозе 15 Гр клетки аденокарциномы шейки матки человека HeLaRR проявляют более высокую миграционную активность по сравнению с исходными клетками после дополнительного облучения в дозах 2 и 4 Гр, однако облучение в дозе 6 Гр эту активность значительно подавляет, что важно при планировании стратегии лучевой терапии.

Соответствие диссертации паспорту специальности

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

Достоверность исследований

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

Для сравнения независимых выборок применялись: параметрический t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни и непараметрический критерий Колмогорова-Смирнова, обеспечивающие надежную оценку значимости различий. Результаты представлены в общепринятом формате с указанием среднего арифметического значения (M) и его стандартной ошибки (m), что отражает точность проведенных измерений.

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

Апробация работы

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

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

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

Публикации

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

Личный вклад автора

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

Структура диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Культуры клеток и условия их культивирования

Все исследования выполняли на культивируемых опухолевых клетках человека: A549 (карцинома легкого с диким типом p53), H1299 (p53-дефицитная немелкоклеточная карцинома легкого) и HeLa (карцинома шейки матки). Клеточные линии A549 и HeLa культивировали в среде DMEM, тогда как для линии H1299 использовали среду RPMI-1640. Обе питательные среды содержали 10% фетальной бычьей сыворотки и антибиотический коктейль. Инкубацию проводили в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) с регулярной (каждые 72 часа) сменой питательной среды. Пассирование осуществляли по достижении 75–80% монослойного покрытия с использованием ферментативной обработки, после чего клетки высаживались для проведения экспериментов, а часть их возвращалась в культуральные флаконы.

Условия радиационного воздействия

Клеточные культуры подвергали облучению на рентгеновской установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) при стандартных температурных условиях (37°C) для поддержания нормального метаболизма клеток во время радиационного воздействия. Для получения выживших клеток (линии A549RR, HeLaRR и H1299RR) проводили острое радиационное воздействие на исходные клетки: мощность дозы 0,85 Гр/мин, напряжение 200 кВ, ток 10 мА (2×5 мА) с алюминиевым фильтром 1,5 мм при суммарной дозе 15 Гр. Доза выбрана как вариант гипофракционированного облучения при стереотаксической радиотерапии различных видов злокачественных новообразований.

После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в течение нескольких недель до стабилизации пролиферативной активности и нормализации фенотипа клеток. Дальнейшее (дополнительное) радиационное воздействие проводили в дозах 5 и 10 Гр, как имитирующее гипофракционированное облучение, так и для выявления приобретенных свойств у выживших после острого облучения в дозе 15 Гр опухолевых клеток. Кроме этого, для построения кривых зависимости доза-эффект по клоногенному тесту и миграционной способности, исходные и выжившие после облучения в дозе 15 Гр опухолевые клетки облучали в дозах 2, 4 и 6 Гр. Эти дозы часто используются в исследованиях, что делает возможным сравнение и интерпретацию своих результатов с данными литературы.

Оценка времени удвоения клеточной популяции

Для сравнительной оценки скорости роста исходных и полученных после облучения в дозе 15 Гр клеток использовали показатель времени удвоения популяции, для чего клетки высевали плотностью 10⁵ клеток на культуральный флакон площадью 25 см². Всего готовили по 10 флаконов для каждой линии клеток и ежедневно в течение 5-суточного периода мониторинга клетки ферментативно (0,25% трипсин, ПанЭко, Россия) снимали с флаконов, переводили в клеточную суспензию с последующим подсчетом в камере Горяева. Для точного построения кривой роста подсчет клеток выполняли дважды в день с интервалом 6 часов (итого 10 флаконов за 5 суток). Результаты представлены в виде средних значений, полученных в 5-6 независимых повторностях опыта.

Иммуноцитохимическое окрашивание на γ H2AX и Ki-67

Для проведения иммуноцитохимического анализа, клеточную суспензию с плотностью 10⁵ клеток/чашку переводили на стерильные покровные стекла, размещенные

в чашках Петри диаметром 35 мм (Corning, США), используя объем среды 3 мл на чашку. Перед проведением экспериментального воздействия клетки инкубировали в стандартных условиях культивирования (37°C, 5% CO₂) для обеспечения адгезии и стабилизации метаболической активности.

Для количественного анализа остаточных фокусов репарации ДР ДНК (γ H2AX) и оценки пролиферативного статуса (наличие белка Ki-67), клетки дополнительно облучали в дозах 5 и 10 Гр. Спустя 24 часа после облучения клетки высаживали на покровные стекла для дальнейшей фиксации, отмывки и окрашивания с последующим переносом на предметные стекла. Процедуру проводили по общепринятому протоколу [Цишнатти А.А. и др., 2019].

Визуализацию и документирование фото образцов проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Япония) с высокочувствительной камерой ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия). Были использованы фильтры: UV-2E/C (DAPI), B-2E/C (FITC/Alexa Fluor 488) и Y-2E/C (Rhodamine). Статистически значимый анализ включал оценку не менее 200 клеток на каждую экспериментальную точку.

Клеточная гибель и клеточный цикл

Для оценки клеточной гибели использовали двойное окрашивание клеток флуоресцентными красителями пропидий йодид и YO-PRO-1. Таким образом, анализ флуоресцентного профиля позволяет дифференцировать: жизнеспособные клетки (YO-PRO-1-/PI-); ранний апоптоз (YO-PRO-1+/PI-); поздний апоптоз (YO-PRO-1+/PI+) и некроз (YO-PRO-1-/PI+).

Для анализа стадий клеточного цикла клетки в экспоненциальной фазе роста подвергали трипсинизации с последующим ресуспендированием в охлажденном фосфатном буфере (10⁷ клеток/группу). Фиксацию осуществляли в 70% этаноле при 4°C в течение 30 минут с последующим хранением при -20°C. На подготовительном этапе клеточную суспензию подвергали двукратному центрифугированию с заменой надосадочной жидкости на свежий фосфатный буфер (pH 7.4). Последующую инкубацию проводили в течение 30 минут при комнатной температуре в светозащищенных условиях с рабочим раствором, содержащим пропидиум йодид в концентрации 0.5 мг/мл и РНКазу. Цитофлуориметрию выполняли на системе BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с регистрацией 50000 событий на каждый анализируемый образец.

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

Цитогенетический анализ

Для оценки генотоксических эффектов применяли цитокинез-блокированный микроядерный тест [Cherubini R., et al. 2011]. По стандартному протоколу микроядерного теста клеточную культуру обрабатывали 3 мкг/мл цитохалазина-Б (Панэко, Россия) на протяжении 22–23 часов для блокирования цитокинеза с формированием двуядерных клеток. После трипсинизации клетки последовательно подвергали: гипотонической обработке 0.75 mM KCl (20 мин, 37°C); фиксации метанол-уксусной кислотой (3:1). Финальным этапом было приготовление препаратов и их окрашивание акридиновым оранжевым.

Количественный анализ частоты образования микроядер выполняли на люминесцентном микроскопе Nikon Eclipse Ni-U (Япония), используя камеру ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Германия). Критерием оценки служил подсчет минимум 1000 двуядерных клеток на экспериментальную группу с распределением их по категориям в зависимости от количества микроядер (1, 2, 3 и более).

Клоногенный тест

Репродуктивную гибель клеток оценивали по количеству колоний, формируемых спустя 3 недели после облучения. Клеточную суспензию с заданной концентрацией, варьирующейся в зависимости от величины дозы облучения, высевали в чашки Петри диаметром 60 мм (Corning, США), содержащие свежую культуральную среду. После инкубации старую среду сливали, колонии фиксировали метанолом и окрашивали 3% раствором Гимзы. Для каждой экспериментальной группы в одном эксперименте использовали минимум 5 чашек. Всего было проведено 5–6 независимых экспериментов. Количественный анализ включал подсчет колоний и расчет показателей выживаемости.

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

Оценку миграционной и пролиферативной активности проводили с помощью теста заживления «раны». Клетки культивировали в 96-луночных планшетах до формирования практически полного монослоя (95% плотности), после чего в клеточном слое создавали стандартизированную царапину («рану») в центре лунки (монослоя) стерильным микропипеточным наконечником. Динамику закрытия дефекта документировали через 0, 12, 24 и 48 часов с использованием высокоточного скринингового микроскопа ImageXpress Micro XL (Molecular Devices LLC, США).

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

$$\text{Площадь зарастания раны, \%} = \frac{At = 0h - At = \Delta h}{At = \Delta h} \times 100\%$$

где $At=0h$ начальная площадь раны (мкм^2) сразу после нанесения царапины ($t = 0h$), а $At = \Delta h$ площадь раны (мкм^2), измеренная через 0, 12, 24 и 48 часов.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ экспериментальных результатов выполняли с применением пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2019, OriginPro 8.5 и Statistica 10.0. Все количественные данные представлены в виде средних арифметических величин, рассчитанных по результатам как минимум трех независимых повторностей эксперимента, с указанием стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка пролиферативной активности выживших и исходных опухолевых клеток человека

Анализ кинетики клеточного роста выявил значительное увеличение времени удвоения популяции у радиорезистентных клонов: для A549RR (31 ч) по сравнению с исходной линией (19 ч), и для HeLaRR (30 ч) относительно исходных клеток (22 ч). В случае H1299RR отмечено умеренное, но статистически значимое увеличение $T_{1/2}$ до 27 часов (против 20 часов у контрольных клеток) (рис. 1).

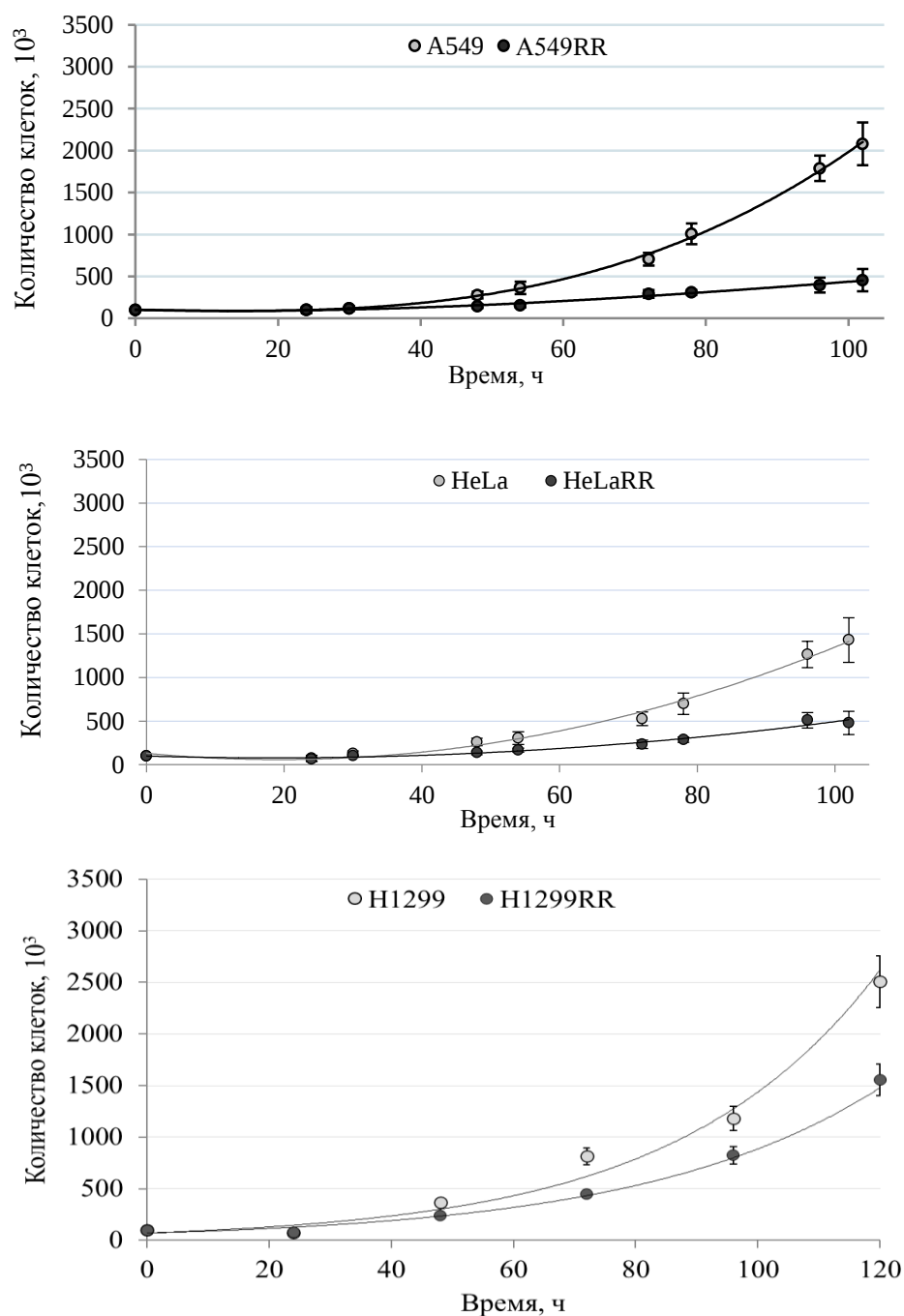


Рисунок 1 - Кривые роста культур клеток линий A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR. Представлены результаты 6 независимых экспериментов

Наблюдаемое увеличение времени удвоения клеточной популяции может отражать как задержки в сверхочных точках клеточного цикла, изменение времени прохождения стадий клеточного цикла, формирование пула клеток в G0 стадии, так и высокий процент гибели делящихся клеток в отдаленный период времени после радиационного воздействия в высокой дозе. Для этого в дальнейшем был проведен анализ уровня гибели облученных клеток и их распределение по стадиям клеточного цикла.

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

Таблица 1 – Процентное распределение гибнущих клеток

Линия	Ранний апоптоз	Поздний апоптоз	Некроз
A549	2.94±0.59	0.49±0.09	1.92±0.38
A549RR	1.05±0.21	2.62±0.52*	6.18±1.24*
HeLa	1.20±0.10	1.46±0.04	4.35±0.32
HeLaRR	1.97±0.08	2.11±0.09	5.84±0.84
H1299	3.56±0.71	14.89±2.98	4.32±0.86
H1299RR	6.22±1.24*	29.43±5.89*	8.73±1.75*

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

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

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

Для оценки пролиферативной активности выживших и исходных опухолевых клеток как без, так с дополнительным радиационным воздействием, использовали маркер пролиферативной активности Ki-67. Было показано дозозависимое уменьшение доли Ki-67+ клеток линии A549 после дополнительного облучения (рис. 2). В клетках линии A549RR также наблюдается уменьшение доли пролиферирующих клеток после дополнительного воздействия рентгеновским излучением в дозах 5 и 10 Гр.

Доля активно пролиферирующих клеток H1299RR без дополнительного облучения была значительно выше этого показателя у исходных клеток (рис. 2). После дополнительного облучения в дозе 10 Гр наблюдалось достоверное снижение доли активно пролиферирующих клеток H1299 по сравнению с H1299RR. Процентное количество позитивных по Ki-67 клеток HeLa оставалась на высоком уровне во всех исследованных группах.

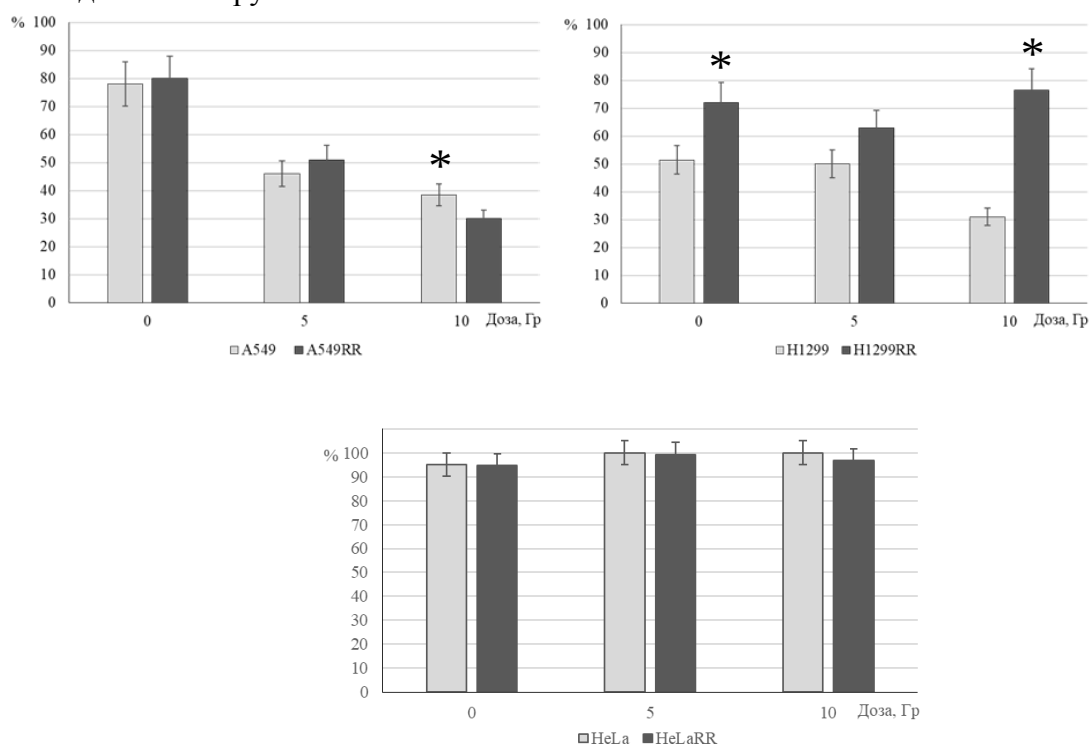


Рисунок 2 - Изменение доли активно пролиферирующих (Ki-67+) клеток линий A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR до и после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр.; * $p < 0,05$

Наблюдаемое уменьшение количества Ki-67-позитивных клеток линий A549 и A549RR после радиационного воздействия свидетельствует о накоплении клеток в стадии G0 клеточного цикла с увеличением дозы дополнительного облучения. У выживших после облучения в дозе 15 Гр клеток HeLaRR, так и исходных клеток, экспрессия Ki-67 остается на высоком уровне, то есть активно проходят все стадии клеточного цикла, поэтому ранее высказанное предположение об изменении (увеличении) времени прохождения стадий клеточного цикла у этих клеток более вероятно. Процент Ki-67-позитивных клеток H1299RR значительно выше исходных H1299, остается на высоком уровне при всех дозах облучения, и не меняется в зависимости от дозы.

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

В результате проведенных исследований выявлено, что клетки A549 в основном находятся в стадии G0/G1 клеточного цикла, где их количество значительно выше, чем у предварительно облученных клеток (рис. 3). В свою очередь, выявлен высокий уровень клеток A549RR в стадии G2/M, который почти в 5 раз превышал значения исходных клеток (рис. 3). При анализе распределения клеток по фазам клеточного цикла спустя 24 часа после воздействия в дозе 5 Гр было установлено, что как в родительской линии A549, так и у линии A549RR большинство клеток находилось в G0/G1-фазе. После облучения в дозе 10 Гр доля клеток A549 и A549RR распределялась примерно поровну между стадиями G0/G1 и G2/M.

Фиксировали низкие показатели доли клеток A549 и A549RR в S фазе, но после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр, доля исходных клеток достоверно выше, чем у предварительно облученных, что, видимо, связано с повышенным уровнем гибели у последних (рис. 3).

Доля клеток линии H1299 в основном находится в стадии G0/G1, как и у клеток линии A549, где их уровень достоверно выше, чем у предварительно облученных клеток, но картина меняется в стадии G2/M, где уже относительное количество клеток линии H1299RR заметно выше, чем у исходных клеток (рис. 3). После воздействия ионизирующим излучением в дозе 5 Гр наблюдается преобладание задержки клеточного цикла на стадии G0/G1 для обеих изучаемых клеточных линий, но также значительная доля клеток линий H1299 и H1299RR находятся в фазе G2/M (рис. 3). В группе клеток, облученных в дозе 10 Гр, наблюдается более высокий показатель у H1299 в стадии G0/G1 по сравнению с клетками H1299RR, но в основном арест клеточного цикла у этих двух линий происходит на стадии G2/M (рис. 3).

Сравнительный анализ выявил достоверное снижение доли S-фазных клеток в линии H1299 по сравнению с предварительно облученными клетками H1299RR, что наблюдалось как в контрольных условиях, так и после облучения в дозах 5 и 10 Гр (рис. 3).

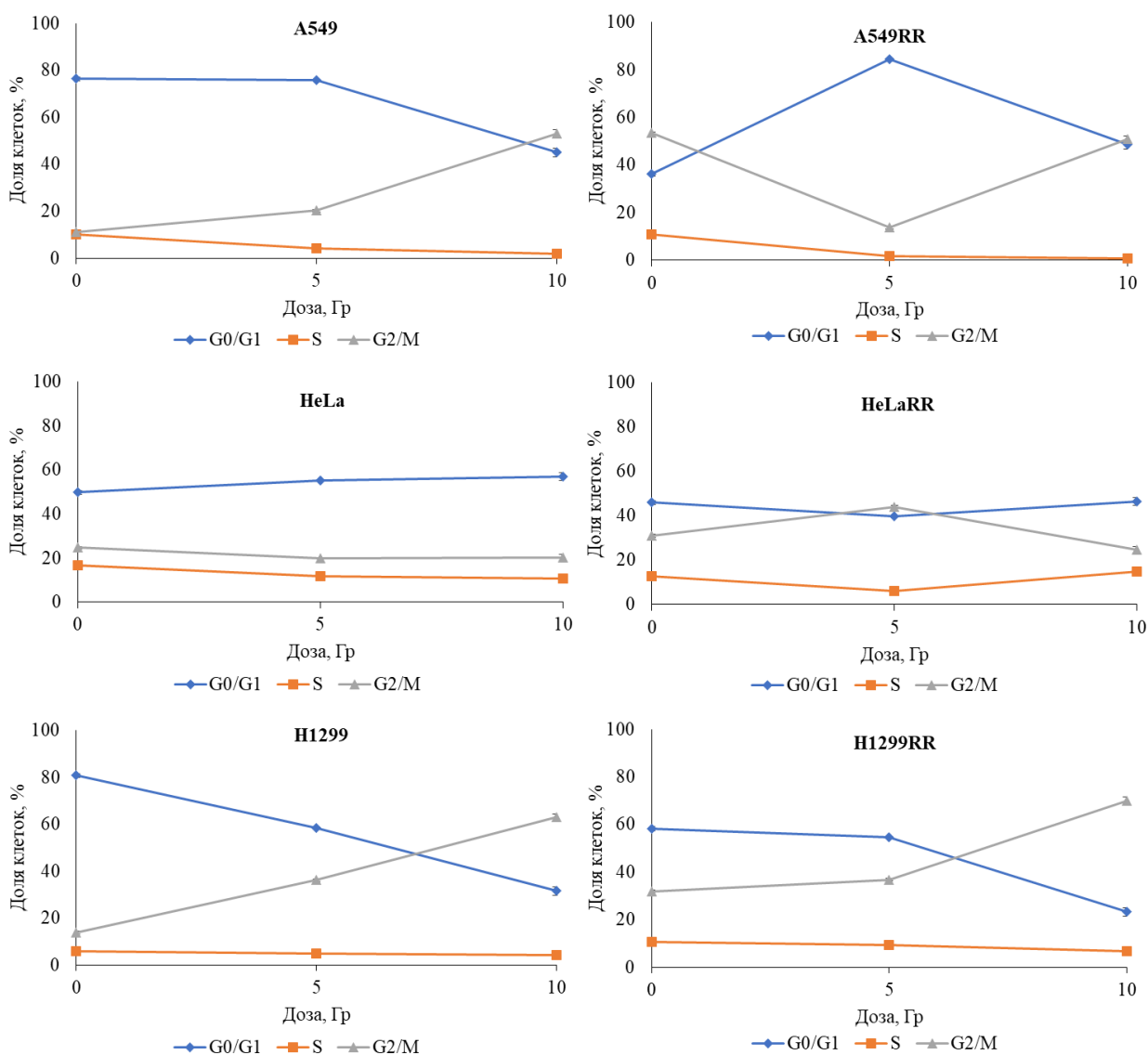


Рисунок 3 – Распределение выживших и исходных опухолевых клеток по фазам клеточного цикла после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр

Самый высокий уровень клеток HeLa и HeLaRR наблюдается в стадии G0/G1(рис. 3). При сравнении клеток линии HeLa и линии HeLaRR после дополнительного облучения в дозе 5 Гр наблюдается значительное количество клеток этих двух линий на стадии G0/G1, где доля клеток линии HeLa достоверно выше. Также наблюдали их достоверное количественное преимущество в G2/M-фазе по сравнению с родительскими после облучения в дозе 5 Гр (рис. 3).

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

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

Количественная оценка выявила достоверно более высокую долю клеток линии A549 на ранних стадиях апоптоза по сравнению с предварительно облученными. Данная закономерность наблюдалась как без облучения, так и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр, что свидетельствует о сохранении повышенной апоптотической чувствительности родительской линии при различных режимах радиационного воздействия (рис. 4).

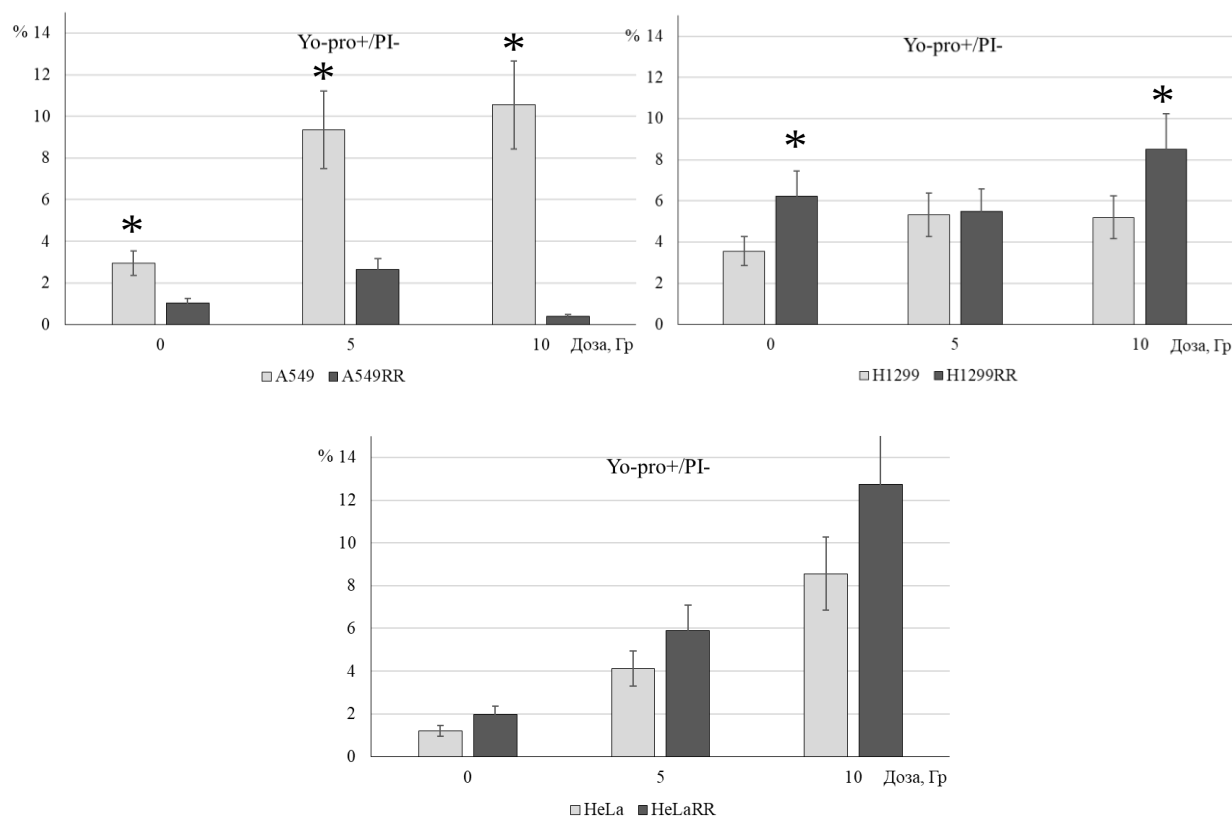


Рисунок 4 - Доля клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR в ранней стадии апоптоза спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр
* $p < 0,05$

Сравнительный анализ линий H1299 и H1299RR не выявил статистически значимых различий в доле раннеапоптотических клеток при сравнении облученных и необлученных образцов. Однако сравнение этих двух линий между собой продемонстрировало повышенный базовый уровень и радиационно-индуцированный (10 Гр) апоптоз в H1299RR относительно родительской линии (рис. 4).

В случае линий HeLa и HeLaRR наблюдалось дозозависимое увеличение клеток в раннем апоптозе после радиационного воздействия (5 и 10 Гр) по сравнению с контрольными условиями. Данный эффект проявлялся в обеих исследуемых линиях, что свидетельствует об активации апоптотических механизмов в ответ на радиационное воздействие (рис. 4).

Количественная оценка клеток линий A549 и A549RR, находящихся на поздней стадии апоптоза, была низка и не превышала 5% во всех экспериментальных группах (рис. 5).

При сравнении H1299 и H1299RR было показано, что доля клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза была достоверно выше в клетках H1299RR для всех групп (рис. 5).

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

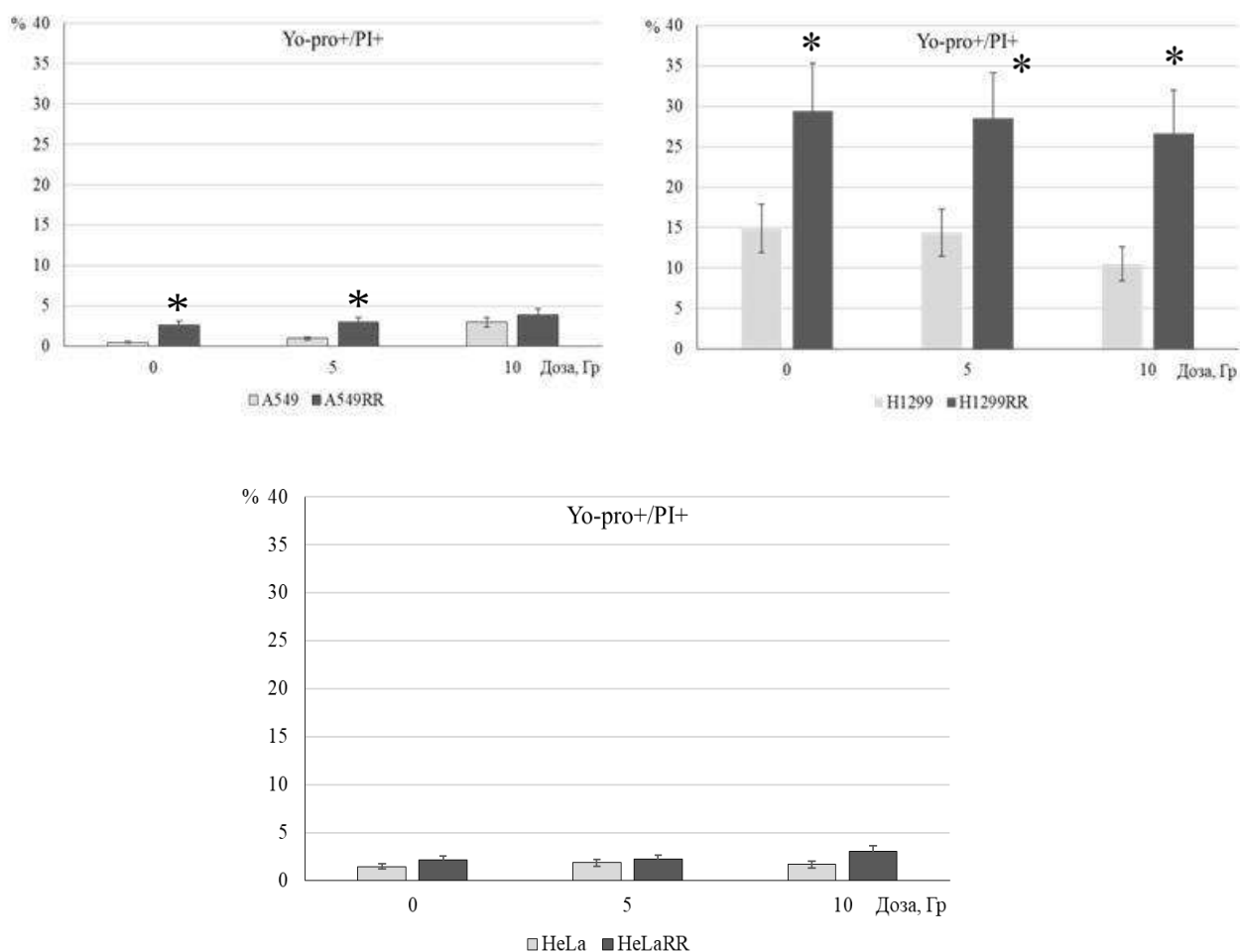


Рисунок 5 - Доля клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR в поздней стадии апоптоза спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр; * p < 0,05

Доля некротических клеток линии A549 достоверно увеличивалась с увеличением дозы облучения (рис. 6). В клетках линии A549RR достоверных различий в экспериментальных группах не наблюдалось. При этом доля облученных клеток, гибнущих по механизму некроза, была больше в линии A549, а в клетках без радиационного воздействия – в линии A549RR.

У клеточных линий H1299 и HeLa достоверных различий в доли некротических клеток после и без облучения выявлено не было, так же, как и у линий H1299RR и HeLaRR (рис. 6). Также наблюдается низкий уровень некротических клеток у линий H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR, который не превышал 10%.

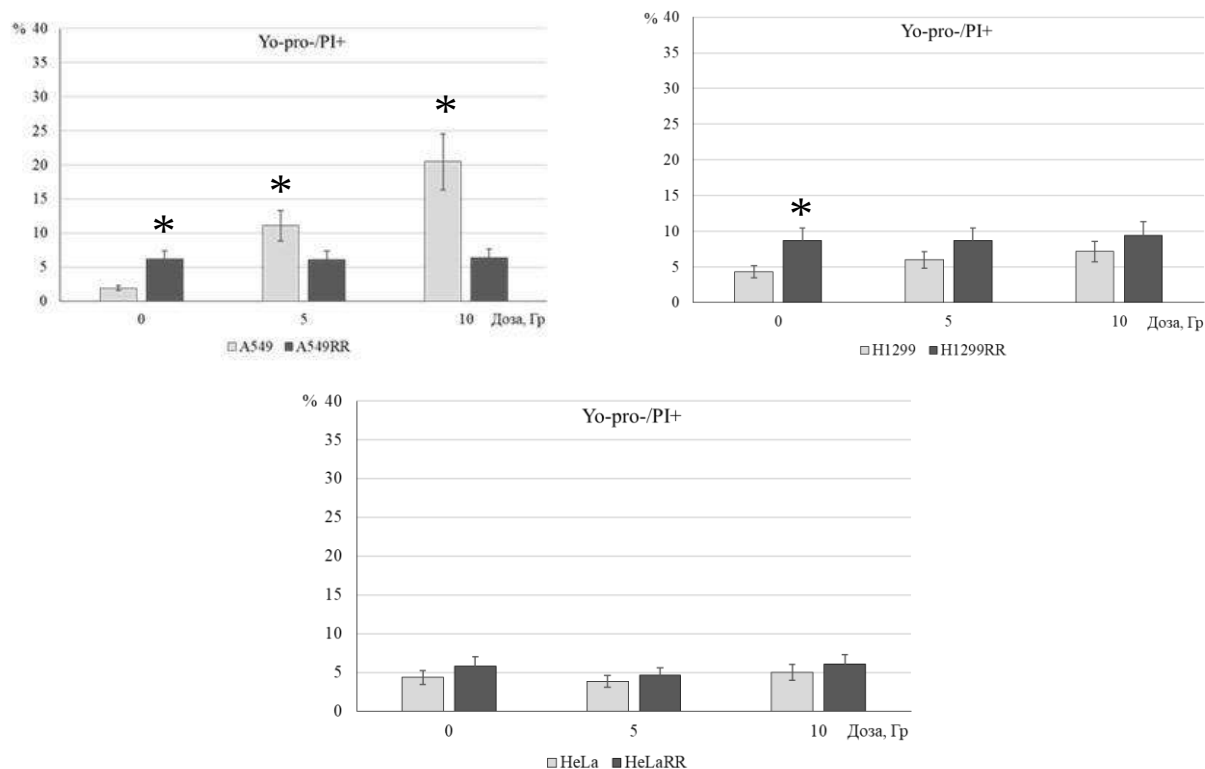


Рисунок 6 - Доля некротических клеток A549, A549RR, H1299, H1299RR, HeLa и HeLaRR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр
* $p < 0,05$

Анализ общей клеточной гибели показал увеличение доли погибших клеток A549 с увеличением дозы излучения (рис. 7). Клеточная линия A549RR демонстрировала стабильный уровень гибели независимо от радиационного воздействия, при этом показатели были достоверно ниже по сравнению с родительской линией A549 во всех экспериментальных группах. Напротив, в линии H1299RR наблюдалось значительное увеличение общего уровня клеточной гибели как без внешнего воздействия, так и после облучения в исследуемом диапазоне доз (5 и 10 Гр) относительно исходных клеток. Процент общей клеточной гибели клеток HeLa и HeLaRR увеличивался с дозой излучения, однако достоверных различий между исходными и выжившими клетками не наблюдали (рис. 7).

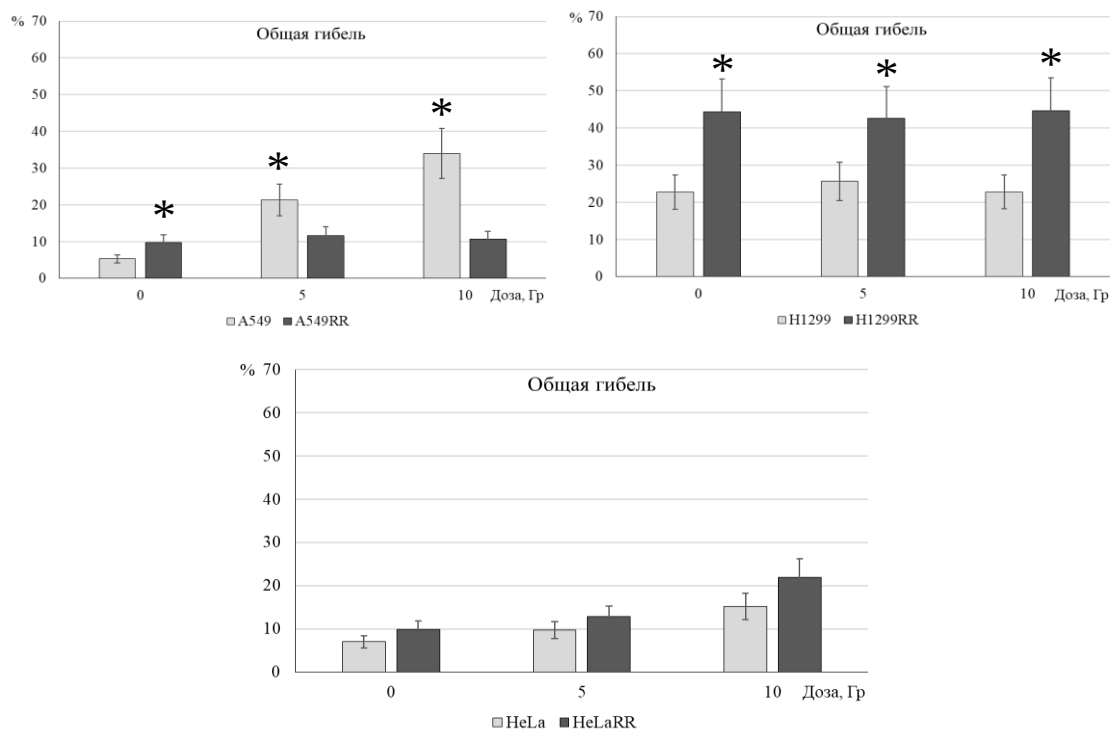


Рисунок 7 - Общая клеточная гибель в популяциях A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр
* $p < 0,05$

Данные по клеточной гибели свидетельствуют о том, что выжившие клетки, дефицитные по гену *p53*, активно делятся, но также активно гибнут ввиду дефицита функции репарации ДР ДНК.

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

Количество ДР ДНК после облучения в дозе 10 Гр в клетках линии A549RR было значительно ниже, чем в клетках линии A549 (рис. 8).

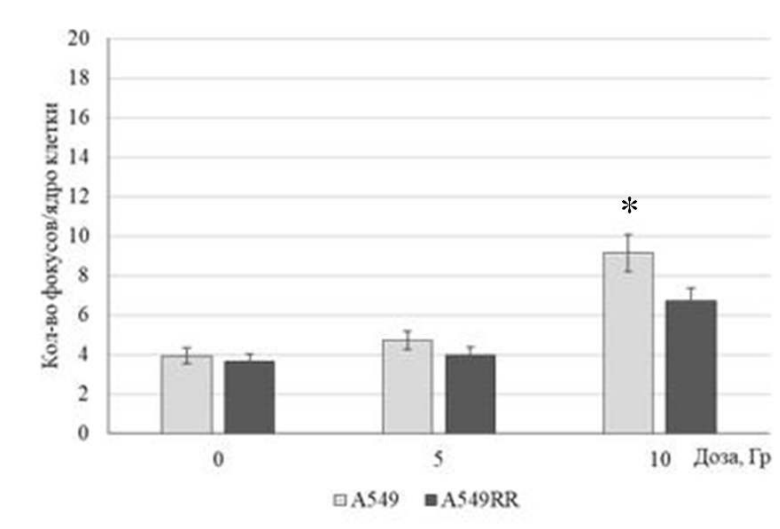


Рисунок 8 - Изменение количества остаточных фокусов γ H2AX линий A549 и A549RR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр
* $p < 0,05$

Количественный анализ остаточных фокусов повреждений ДНК выявил существенно меньшую частоту γ H2AX в линии HeLaRR относительно контроля при всех исследованных дозах облучения, что отражает высокую способность этих клеток к устранению радиационно-индуцированных повреждений генома (рис. 9).

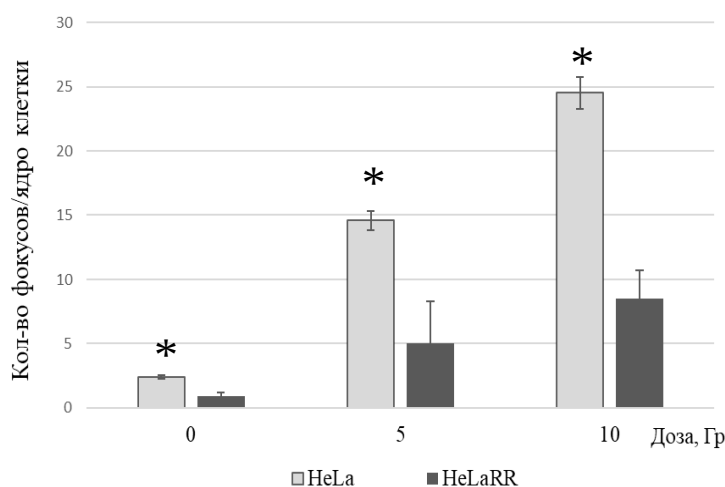


Рисунок 9 - Изменение количества остаточных фокусов γ H2AX линий HeLa и HeLaRR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр
* $p < 0,05$

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

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном снижении эффективности репарации ДНК в p53-дефицитных клетках после радиационного воздействия в дозе 10 Гр. Наблюдаемый дефицит восстановления ДНК подчеркивает критическую роль белка p53 в координации репарационных механизмов при генотоксическом стрессе.

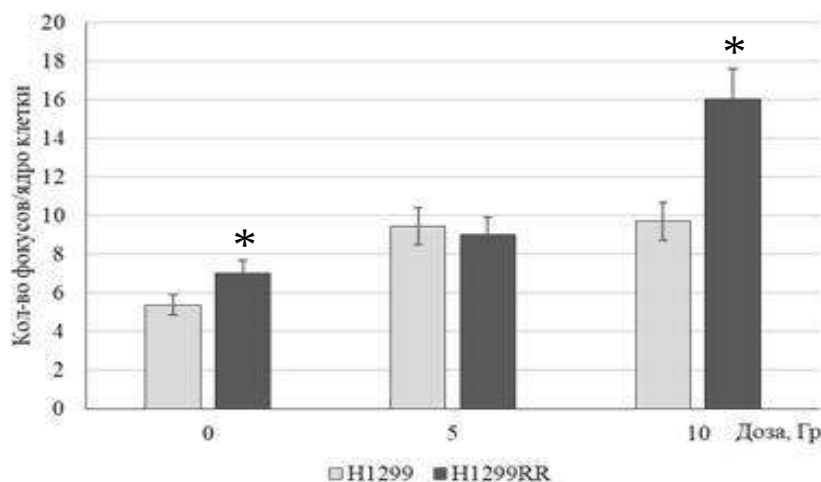


Рисунок 10 - Изменение количества остаточных фокусов γ H2AX линий H1299 и H1299RR спустя 24 часа после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр
* $p < 0,05$

В исходных клетках A549 и HeLa было показано дозозависимое увеличение количества МЯ на двуядерную клетку, а у выживших клонов этих линий доля таких клеток после дополнительного воздействия была значительно ниже, чем у предварительно необлученных (рис. 11 и рис. 12).

Клеточная линия H1299 демонстрировала стабильно низкий уровень образования микроядер (МЯ), не зависящий от дозы дополнительного облучения, что контрастировало с показателями линий A549 и HeLa. При этом в радиорезистентном клоне H1299RR зафиксирована парадоксальная дозовая зависимость - достоверно более высокая частота МЯ после облучения в дозе 5 Гр по сравнению с воздействием 10 Гр (рис. 13). Учитывая результаты, описанные выше, можно предположить, что низкий уровень МЯ в этих клетках после облучения в дозе 10 Гр связан преимущественно с высоким уровнем их гибели.

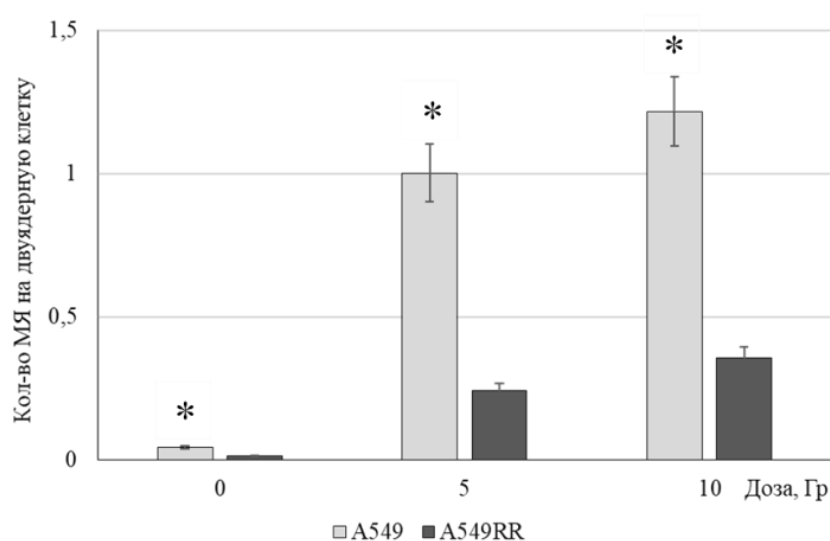


Рисунок 11 - Количество МЯ на двуядерную клетку A549 и A549RR без и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр
* $p < 0,05$

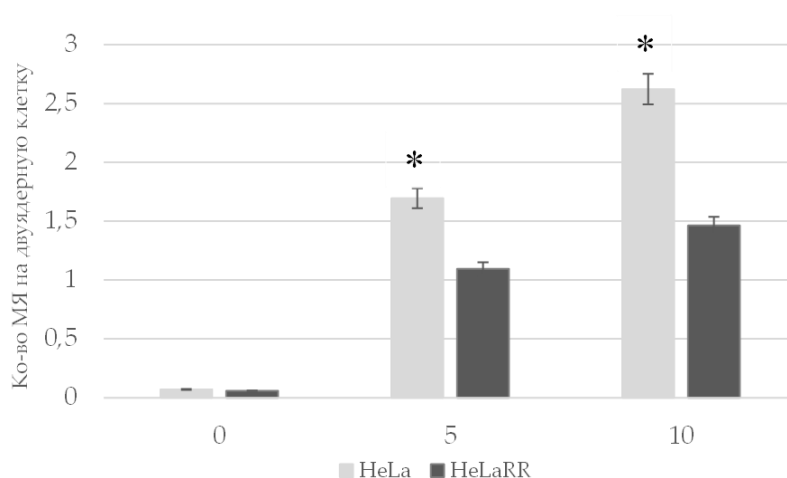


Рисунок 12 - Количество МЯ на двуядерную клетку HeLa и HeLaRR без и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр
* $p < 0,05$

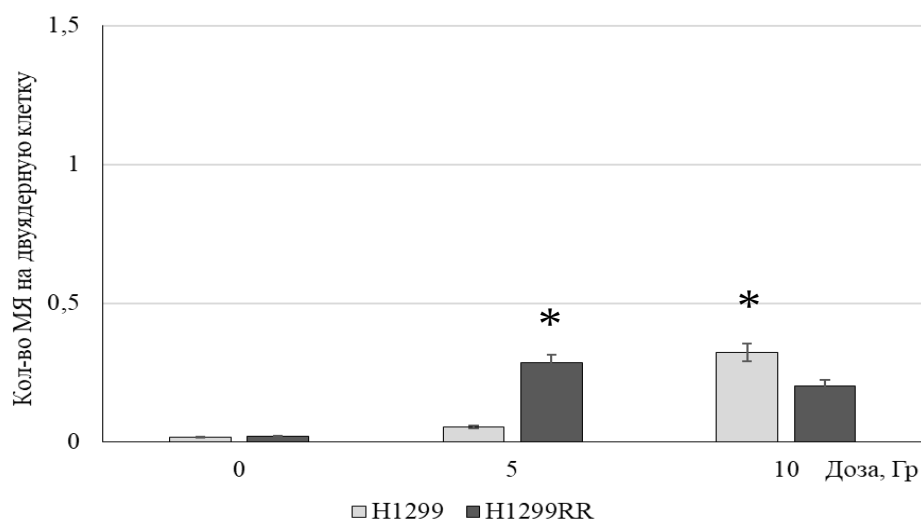


Рисунок 13 - Количество МЯ на двуядерную клетку Н1299 и Н1299RR без и после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр
* $p < 0,05$

Также было проведено сравнение долей клеток как без, так и содержащих 1, 2, 3, более 3 МЯ. При сравнении данных, полученных на клетках линий А549 и А549RR, было показано увеличение доли клеток без МЯ в А549RR в обеих тестовых группах, подвергавшихся облучению (рис. 14). Примерно такую же зависимость можно наблюдать и у линий Н1299 и Н1299RR, у которых доля клеток без МЯ оставалась значительно высокой во всех трех экспериментальных группах (рис. 14). Касаясь клеток HeLa и HeLaRR, то в каждой клеточной линии наблюдается увеличение доли клеток, содержащих 1, 2, 3 и более 3 МЯ во всех трех экспериментальных группах по сравнению с А549 и А549RR, Н1299 и Н1299RR, и даже наблюдается резкий скачок по количеству клеток линии HeLa содержащих более 3 МЯ после дополнительного облучения в дозе 10 Гр (рис. 14).

Таким образом, в выживших клетках А549RR и HeLaRR наблюдаются более низкие показатели выхода цитогенетических нарушений после дополнительного облучения в дозах 5 и 10 Гр. Клетки линий Н1299 и Н1299RR имеют значительно более низкие показатели по выходу МЯ во всех экспериментальных группах, что мы связываем со значительной долей погибших клеток.

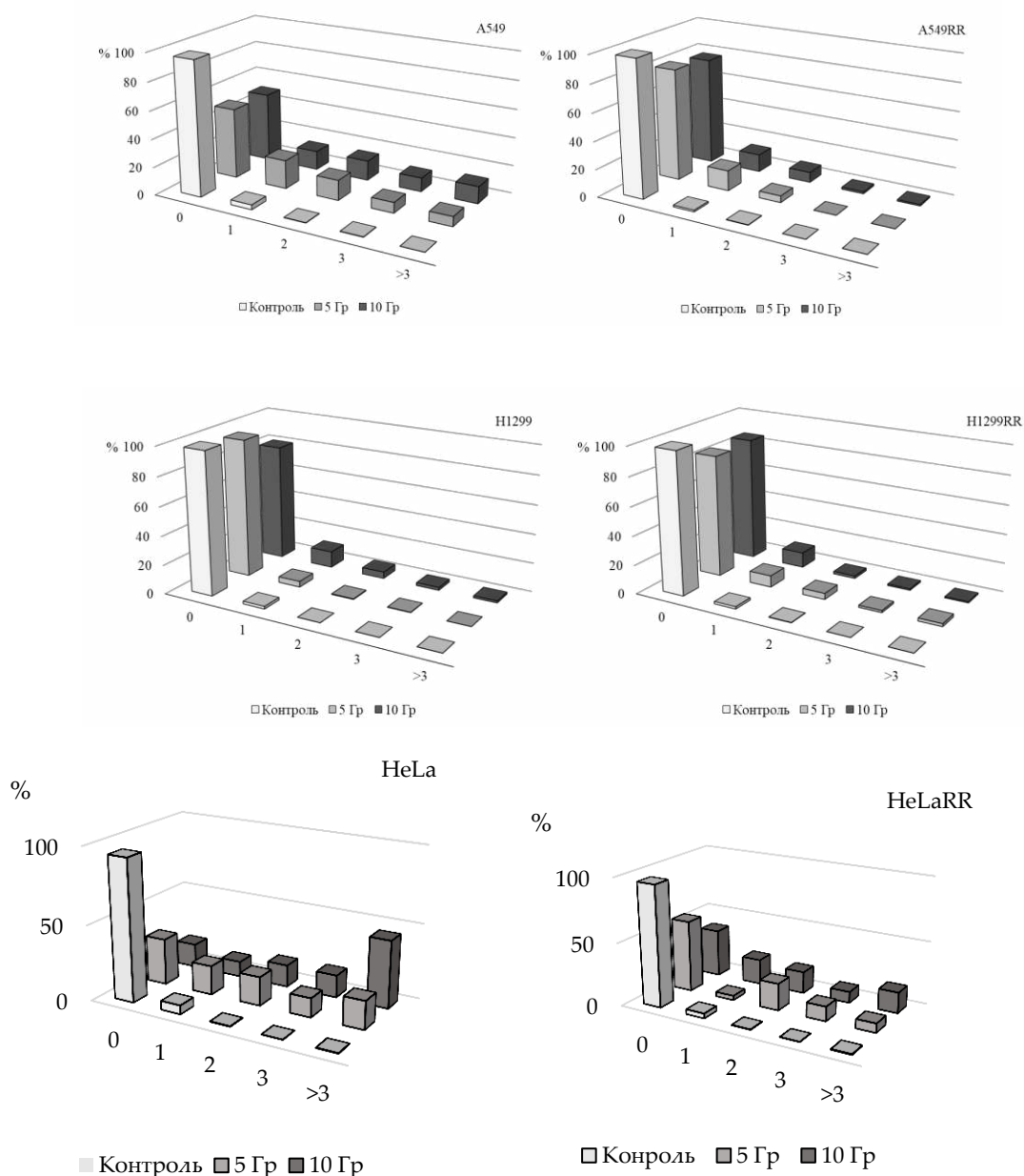


Рисунок 14 - Доли клеток, содержащих 1, 2, 3, более 3 МЯ и не содержащих МЯ в клеточных линиях A549, A549RR, HeLa, HeLaRR, H1299, H1299RR без облучения и после дополнительного облучения в дозах 5 Гр и 10 Гр

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

Согласно данным, представленным на рисунке 15, предварительно облученные клетки A549RR характеризуются более высокой репродуктивной жизнеспособностью после дополнительного радиационного воздействия в дозах 2 и 4 Гр по сравнению с родительской линией A549.

Кривые репродуктивной выживаемости клеток HeLa и HeLaRR демонстрируют существенные отличия от других исследуемых линий. Наибольшая радиочувствительность наблюдается при дозе 6 Гр, что проявляется максимальным уровнем репродуктивной гибели. При этом предварительно облученные клетки HeLaRR показывает статистически значимо более высокую выживаемость после облучения в дозе 2 Гр по сравнению с родительской линией (рис. 15).

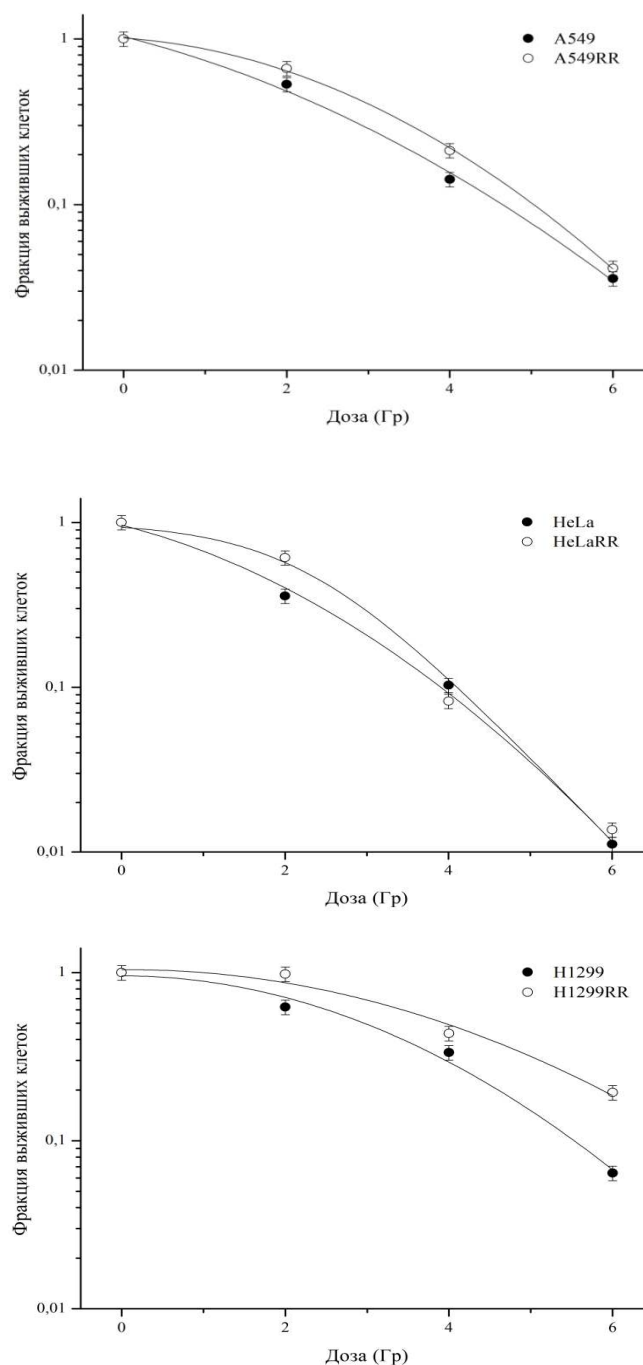


Рисунок 15 - Клоногенная выживаемость A549, A549 RR, HeLa, HeLaRR, H1299 и H1299RR, после дополнительного облучения в дозах 2 Гр, 4 Гр и 6 Гр

Клеточные p53-дефицитные линии H1299 и H1299RR демонстрируют высокие показатели по выживаемости в сравнении с другими исследуемыми линиями при всех дополнительных дозах облучения (рис. 15). По нашему мнению, этот феномен обусловлен следующими ключевыми факторами: сохранением высокого пролиферативного потенциала, отсутствием p53-зависимых остановок клеточного цикла, эффективной элиминацией поврежденных клеток, ускоренной селекцией радиорезистентных клонов.

Были рассчитаны основные показатели линейно-квадратичного уравнения (ЛКУ). Сравнительный анализ соотношений α/β для различных клеточных линий выявил существенные различия в радиочувствительности (Таблица 2): исходные линии A549 и HeLa показали более высокие значения (5,67 и 7,69 соответственно); радиорезистентные клоны A549RR и HeLaRR продемонстрировали сниженные показатели (0,99 и 3,12);

клетки линии H1299RR показали увеличение коэффициента по сравнению с родительской линией H1299 (0,19 и 0,01 соответственно).

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

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

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

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

Каждая экспериментальная линия клеток подвергалась облучению в дозах 2, 4 и 6 Гр. У клеток линии A549 миграционный потенциал высок и имеет достоверные различия в большинстве групп, что показано на рисунке 16 (А-Г). У клеток линии A549RR процесс «заживления раны» происходил быстрее в первые сутки для всех групп, чем у клеток A549, что может указывать на большее количество повреждений у последних.

В работе определяли миграционную активность клеток HeLa и HeLaRR (рис. 17). Клетки линии HeLaRR демонстрируют стабильно высокий уровень миграционной активности как без радиационного воздействия, так и после облучения в дозах 2 и 4 Гр (рис. 17А-В). Однако после облучения в дозе 6 Гр наблюдаем обратную картину: исходные клетки HeLa проявляют более высокую миграционную активность по сравнению с HeLaRR.

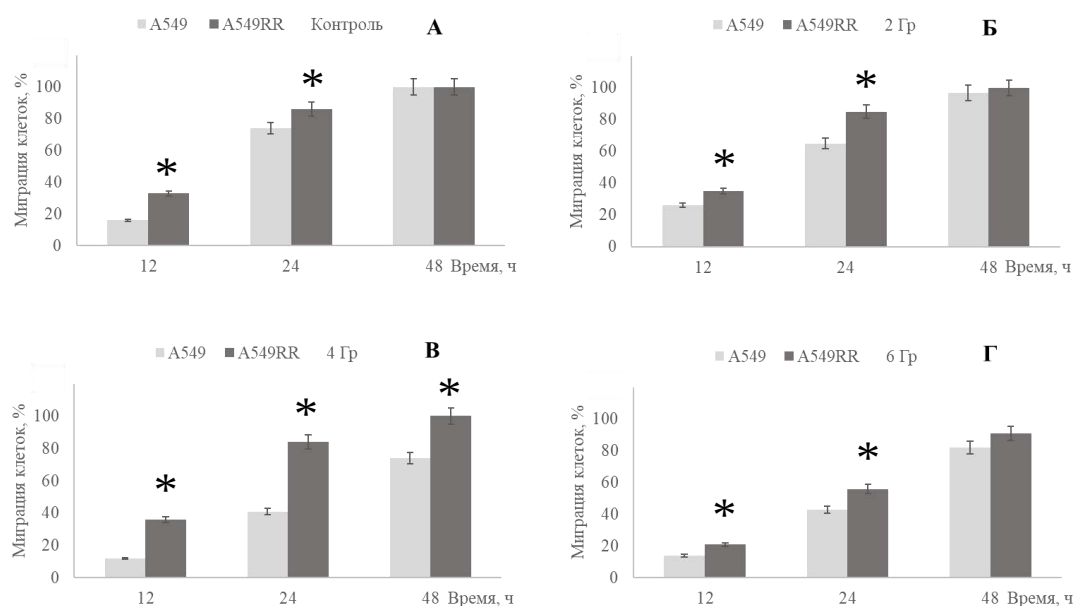


Рисунок 16 - Миграционная активность клеток A549, A549RR, спустя 12 ч, 24 ч и 48 ч после дополнительного облучения в дозах 2 Гр, 4 Гр и 6 Гр

* p < 0,05

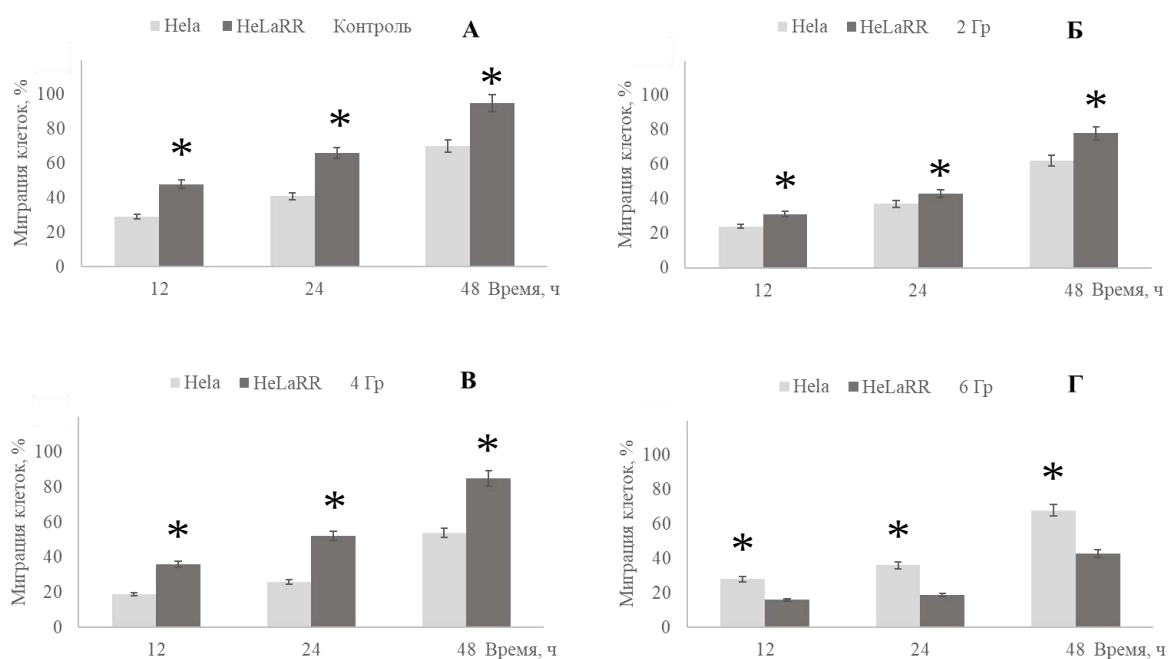


Рисунок 17 - Миграционная активность клеток HeLa и HeLaRR, спустя 12 ч, 24 ч и 48 ч после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр
* $p < 0,05$

Сравнительная оценка миграционного потенциала клеточных линий H1299 и H1299RR не выявила статистически значимых различий между ними. В обеих исследуемых группах наблюдалось полное закрытие «раны» в течение 48-часового интервала наблюдения как в условиях отсутствия облучения, так и после радиационного воздействия в дозах 2, 4 и 6 Гр (рис. 18).

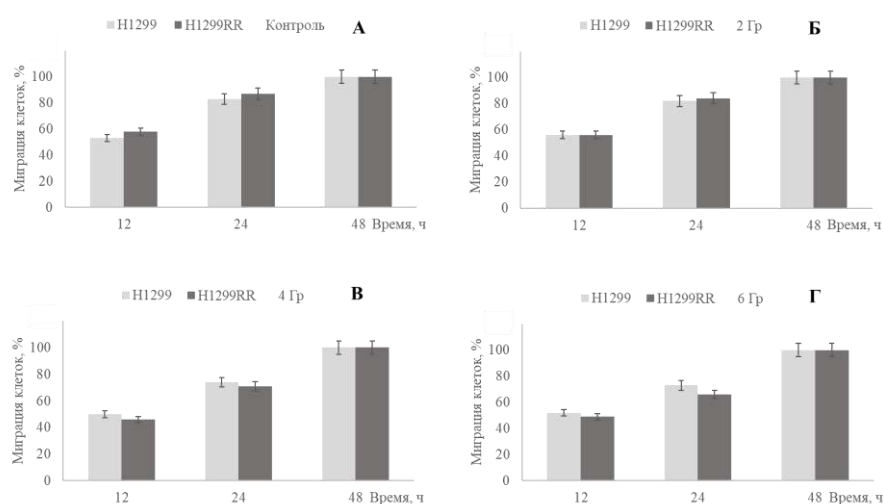


Рисунок 18 - Миграционная активность клеток H1299 и H1299RR спустя 12, 24 и 48 ч после дополнительного облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр

p53-дефицитные клетки НМРЛ, как предварительно облученные, так и нет, обладают более высокой пролиферативной активностью, миграционным потенциалом и устойчивостью к радиации, чем клетки других изученных карцином. На фоне нарушенной

репарации ДНК и массовой гибели клеток в этой популяции быстро формируются устойчивые клоны к последующим радиационным воздействиям, что значительно снижает эффективность лучевой терапии.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

5. Отмечен низкий уровень остаточных фокусов γ H2AX в клетках A549RR после облучения в дозе 10 Гр по сравнению с исходными. Также наблюдали значительное снижение этого показателя у клеток линии HeLaRR как без воздействия, так и после дополнительного воздействия в дозах 5 и 10 Гр, что свидетельствует о селекции клеток с более эффективной репарацией повреждений ДНК после острого облучения в дозе 15 Гр. У выживших после облучения в дозе 15 Гр клеток H1299RR фиксировали значительное увеличение количества остаточных фокусов γ H2AX после дополнительного облучения в дозе 10 Гр.

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

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности опухолевых клеток человека линии HeLa, выживших и давших устойчивый рост после острого рентгеновского облучения. Д. В. Гурьев, А. А. Цишнатти, С. М. Роднева, Ю. А. Федотов, Д. В. Молодцова, Т. М. Блохина, Е. И. Яшкина, А. Н. Осипов. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Том 67. № 4. С. 5–9 (Цитирование в ВАК. Scopus. Q4, вклад автора – 70%).
2. Clonogenic Capacity and Migration Potential of A549 and HeLa Cell Lines Survived after Acute X-Ray Irradiation at a Dose of 15 Gy. / Tsishnatti, A.A., Rodneva, S.M., Fedotov, Y.A. et al. // Bull Exp Biol Med 178, 764–768 (2025). <https://doi.org/10.1007/s10517-025-06413-y> (Цитирование в Web of Science. Scopus. Q3, вклад автора - 70%).
3. Особенности формирования биологических эффектов в культивируемых опухолевых клетках человека линии A549 при воздействии ионизирующего излучения с различной мощностью дозы. Стельмухова В. А., Цишнатти А. А., Сметанина Н. М., Федотов Ю. А., Гурьев Д. В. Вестник Национального исследовательского ядерного университета "МИФИ". – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 209–217. – DOI 10.56304/S2304487X22030105. – EDN ILXATU. (Цитирование в ВАК, вклад автора – 40%).
4. Влияние облучения в сверхвысоких дозах на криоконсервированные мезенхимальные стволовые клетки: двунитевые разрывы ДНК и пролиферативная активность. Цишнатти А. А., Пустовалова М. В., Грехова А. К., Бушманов Ю. А., Астрелина Т.А., Кобзева И. В., Никитина В. А., Брунчуков В. А., Усупжанова Д. Ю., Барабаш И. М., Блохина Т. М., Федотов Ю. А., Воробьева Н. Ю., Самойлов А. С., Осипов А. Н. Медицинская радиология и радиационная безопасность. Москва, 2019. Том 64 №4. С. 18–24. (Цитирование в ВАК. Scopus. Q4, вклад автора – 40%).
5. Increased Yield of Residual γ H2AX Foci in p53-Deficient Human Lung Carcinoma Cells Exposed to Subpicosecond Beams of Accelerated Electrons / N. Yu. Vorobyeva, N. S. Babayan, B. A. Grigoryan, A. A. Sargsyan, L. G. Khondkaryan, L. S. Apresyan, A. K. Chigasova, E. I. Yashkina, D. V. Guryev, S. M. Rodneva, A. A. Tsishnatti, Yu. A. Fedotov, R. M. Arutyunyan, A. N. Osipov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2022. – Vol. 172, No. 6. – P. 756-null. – DOI 10.1007/s10517-022-05472-9. – EDN VFJCOM. (Цитирование в Web of Science. Scopus. Q3, вклад автора - 20%).
6. Изучение механизмов радиорезистентности опухолевых клеток человека / А.А. Цишнатти, С. М. Роднева, Д. В. Молодцова, Н. М. Сметанина, Ю. А. Федотов, Д.В. Гурьев. // VIII съезд по радиационным исследованиям. Москва, 12–15 октября 2021 г. – Дубна ОИЯИ – С 113.
7. Study of mechanisms involved in the radioresistance of human tumor cells / A.A. Tsishnatti, S.M. Rodneva, N.M. Smetanina, Yu.A. Fedotov, D.V. Guryev // 4th International Symposium and International School for Young Scientists on “Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine” October 26-30, 2019. National research nuclear university mephi (Moscow Engineering Physics Institute) – P. 209-210.
8. Изучение механизмов радиорезистентности опухолевых клеток человека / А. А. Цишнатти, С. М. Роднева, Н. М. Сметанина [и др.] // Радиобиологические основы лучевой терапии: материалы 3-й Российской конференции с международным участием, Дубна, 17–18 октября 2019 года. – Дубна: Объединенный институт ядерных исследований, 2019. – С. 155–157.
9. Молекулярно-клеточные показатели радиорезистентности опухолевых клеток человека / С. М. Роднева, А.А. Цишнатти, Н. М. Сметанина, Ю. А. Федотов, Д. В. Гурьев // Сборник трудов школы-конференции молодых учёных «Ильинские чтения». – М.: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2019. – С 76–78.