

МЕЛЬНИКОВА АНЖЕЛИКА АЛЕКСАНДРОВНА

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

Специальность: 1.5.1. Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Диссертация выполнена в Обнинском институте атомной энергетики — филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Обнинск.

Научный руководитель:

Комарова Людмила Николаевна, доктор биологических наук, доцент, профессор Отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ.

Официальные оппоненты:

Кузьмина Нина Станиславовна - доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник Лаборатории экологической генетики Отдела генетической безопасности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук;

Вагин Константин Николаевич - доктор биологических наук, заведующий Отделением радиобиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского».

Защита диссертации состоится «10» июня 2026 г. в 12:00 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» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России) по адресу: 123182, г. Москва, ул. Живописная, 46. Корп. 8а, 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/nauka/dissertatsionnyy-совет/>

Автореферат разослан «15» апреля 2026 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Шандала Наталия Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Значительный рост онкологических заболеваний в Российской Федерации (более 600 000 случаев ежегодно) [Каприн А.Д., 2024] 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. 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.

Цитотоксичность ионизирующего излучения и ДНК-повреждающих агентов опосредована индукцией апоптоза, регулируемого балансом про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Проапоптотический ген *PMAIP1*, кодирующий белок Noxa, инициирует каскад посредством ингибирования антиапоптотических белков (Mcl-1) и активации Bax/Bak. Survivin, как ключевой представитель семейства белков, блокирующих апоптоз, является привлекательной молекулярной мишенью для противоопухолевой терапии. Это обусловлено его ключевой функцией в регуляции клеточного цикла и подавлении апоптотических сигналов, его активным участием в процессах злокачественной трансформации, метастатической диссеминации и формировании устойчивости к химиотерапевтическим агентам. Критически важным является и тот факт, что экспрессия Survivin в неопластических тканях существенно превышает таковую в здоровых соматических клетках.

С учетом вышеизложенного, для исчерпывающего понимания молекулярных механизмов радиочувствительности опухолевых клеток актуальным является исследование экспрессионных профилей основных регуляторов апоптоза в условиях воздействия ионизирующего излучения.

Степень разработанности проблемы

Несмотря на обширный объем исследований, посвященных изучению влияния ионизирующего излучения на клетки различного генеза [Бекетов Е.Е. и др., 2019; Kuchur O.A., et al. 2023; Liang J., et al. 2024; Park J.I., et al. 2024; Ritner C., et al. 2023; Steelman L.S., et al. 2020], 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. С целью внесения вклада в решение этой научной задачи, в настоящей работе предполагается охарактеризовать динамику транскрипционной активности генов *BIRC5* и *PMAIP1*, подвергнутых воздействию γ -излучения, протонов, ионов ^{12}C как в условиях монотерапии, так и в случае комбинированного действия с широко используемым противоопухолевым препаратом (доксорубицином).

Цель и задачи

Целью настоящего исследования являлась 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, HUH-7, HeLa, SK-N-BE(2) 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

Получены новые данные, демонстрирующие дифференциальное влияние ионизирующего излучения различного качества на исследуемые клеточные линии. Использование мультипараметрического подхода,

включающего оценку клоногенной, пролиферативной (время удвоения) и метаболической активности (МТТ-тест), жизнеспособности (проточная цитометрия с использованием 7-AAD), а также анализ экспрессии генов, регулирующих апоптоз (*BIRC5* и *PMAIP1*), позволило обеспечить более полную и достоверную характеристику биологического ответа клеток.

Впервые установлена корреляционная зависимость между физическими характеристиками излучения, молекулярными механизмами клеточного ответа и фенотипическими проявлениями радиочувствительности/радиорезистентности исследуемых клеточных линий, обеспечивая основу для разработки предиктивных моделей ответа на лучевую терапию, а также обоснование персонализированных радиотерапевтических стратегий, направленных на повышение эффективности лучевого лечения посредством воздействия на новые молекулярные мишени с использованием радиосенсибилизаторов.

Теоретическая и практическая значимость

Данное радиобиологическое исследование вносит вклад в фундаментальное понимание клеточного ответа на комбинированное действие химиопрепарата 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 обладают потенциалом для разработки 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. Полученные данные могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов, определяющих радиочувствительность клеток (например, роль апоптоза, эффективность репарации ДНК). Целенаправленное воздействие на выявленные молекулярные мишени (например, гены *BIRC5* и *PMAIP1*) может повысить чувствительность опухолевых клеток к облучению. Результаты диссертационного исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность и образовательный процесс отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ при изучении студентами направлений подготовки 03.03.02 – Физика, 06.03.01, 06.04.01 – Биология, 31.05.01 – Лечебное дело 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: линии опухолевых клеток (MCF-7, HeLa, SK-N-BE(2), HUH-7), репрезентирующие различные типы злокачественных новообразований, а также фибробласты линии hTERT.

Клеточные культуры подвергались воздействию различных видов ионизирующего излучения. Эти процедуры включали облучение фотонами, а также тяжелыми заряженными частицами (ионами и протонами). Все экспериментальные сессии проводились на специализированном оборудовании, расположенном в научно-исследовательских и медицинских учреждениях.

Для всесторонней оценки радиобиологических эффектов применялся комплексный подход, включающий: клоногенный анализ, оценку пролиферативной и метаболической активности, а также жизнеспособности клеток посредством проточной цитометрии. Экспрессия генов была исследована с использованием стандартизованных протоколов выделения тотальной РНК (набор RNA Solo), а количественная оценка осуществлялась спектрофотометрически. Обратная транскрипция и ПЦР-РВ проводились с использованием набора OneTube RT-PCR (флуоресцентный индикатор SYBR Green I). Идентификация сигнальных каскадов и биологических процессов, находящихся под контролем изучаемых генов, была реализована посредством анализа белок-белковых взаимодействий с использованием ресурса STRING. Визуализация полученной сети выполнялась в программной среде Cytoscape v3.10.3. Функциональная характеристика компонентов белковой сети была произведена на платформе Metascape. Обработка статистических данных осуществлялась при помощи 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 доксорубина 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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Результаты диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 1.5.1 «Радиобиология», в частности к пунктам 1, 2, 4, 5.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается репрезентативностью исследуемой выборки (5 клеточных линий), использованием современных методов исследований, обработкой полученных данных с применением методов статистического анализа в современных программных средствах (Microsoft Excel 2019, IBM SPSS Statistics 26 и OriginPro 8).

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 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 материала для проведения молекулярно-генетических исследований с помощью ПЦР-РВ и анализа методом проточной цитометрии. Сбор, статистический анализ и интерпретация экспериментальных данных были осуществлены лично, что послужило основой для формулирования выводов и заключения исследования. Материалы, полученные в ходе работы, были подготовлены к публикации в научных журналах и представлены на профильных международных и всероссийских научно-практических конференциях.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 30 работ, в том числе 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования основных научных результатов диссертационного исследования, 23 тезиса доклада.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает в себя 32 отечественных и 133 зарубежных источников. Иллюстративный материал диссертации состоит из 47 рисунков и 16 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение диссертационной работы содержит обоснование актуальности исследуемой проблемы, описание значимости полученных результатов, сформулированы цель и задачи исследования, определяющие его методологические рамки.

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, детально 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 апоптоз, включая внутренний и внешний митохондриальный пути, с особым вниманием к роли белка Noxa и ингибитора апоптоза Survivin.

Глава 2. Материалы и методы

Культуры клеток и условия культивирования. Объектами радиобиологического исследования были выбраны клеточные линии MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы), HeLa (клетки карциномы шейки матки), HUH-7 (клетки гепатокарциномы), SK-N-BE(2) (клетки нейробластомы), hTERT (иммортиализованные фибробласты человека). Первоначально клеточный материал подвергался воздействию цитотоксического агента в концентрации 0,004 мг/мл, а затем – ионизирующего излучения.

Условия облучения. Эксперименты по облучению клеточных культур ионами ^{12}C были выполнены на синхротроне У-70 НИЦ «Курчатовский институт», г. Протвино. Процесс осуществлялся в водном фантоме при средней энергии пучка 455 МэВ/нуклон. Линейная передача энергии на начальном участке составляла 11 кэВ/мкм, достигая 120–140 кэВ/мкм в области пика Брэгга. Опухолевые клеточные линии подвергались воздействию в зоне пика Брэгга, тогда как облучение фибробластов осуществлялось в его хвостовой части. Интервал доз составил от 2 до 10 Гр.

В качестве источника γ -излучения применялся радиоактивный изотоп ^{60}Co , испускающий гамма-кванты с энергией 1,25 МэВ. Суспензию клеток облучали на гамма-установке радиационного облучения, расположенной в

НИЦ «Курчатовский институт» ФГБНУ «ВНИИРАЭ». Мощность дозы составила 0,9 Гр/мин. Диапазон доз облучения варьировался от 2 до 10 Гр.

Облучение клеток протонами проводилось на терапевтическом комплексе «Прометеус» (МРНЦ им. А.Ф. Цыба, г. Обнинск). 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, тогда как облучение нормальных клеток – в его хвостовой части.

Оценка ОБЭ и коэффициента взаимодействия факторов. Показатель ОБЭ рассчитан как отношение поглощенной дозы стандартного излучения к дозе исследуемого ионизирующего излучения, необходимой для достижения идентичного биологического эффекта.

Для описания эффектов совместного действия ионизирующего излучения и доксорубина использован коэффициент взаимодействия, отражающий отношение наблюдаемого эффекта комбинированного действия двух агентов к сумме эффектов, вызванных каждым агентом по отдельности.

Определение клоногенности. По завершению облучения клетки переносили в стерильные чашки Петри для дальнейшего культивирования. Клеточные культуры подвергались контролируемому инкубированию в течение интервала, охватывающего от 7 до 14 суток. Эффективность колониеобразования оценивалась в процентах: отношение числа жизнеспособных, формирующих колонии клеток, к общему числу высеванных клеток в исследуемой группе, с последующей нормализацией относительно выживаемости контрольных образцов.

Определение времени удвоения. Для определения времени удвоения клетки после завершения облучения ресуспендировали и переносили в стерильные чашки Петри с плотностью 10^4 клеток на чашку. После 24-часовой инкубации проводили подсчет клеток в камере Горяева с последующим расчетом по стандартной формуле:

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

где tp – продолжительность культивирования, N_1 – исходная численность клеток, тогда как N_2 – конечная численность клеток.

Анализ метаболической активности клеток. Суспензию клеток переносили в 96-луночный планшет и культивировали 72 ч. По истечении этого периода, в каждую лунку добавляли 20 мкл рабочего раствора МТТ и инкубировали 2 ч. Далее в каждую лунку вносили раствор ДМСО. Измерение оптической плотности (ОП) каждой лунки осуществлялось при 530 нм с референсным вычитанием поглощения при 630 нм, используя планшетный фотометр Multiskan FC.

Анализ жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии. Для оценки жизнеспособности клеток в настоящей работе использовали краситель 7-аминоактиномицин D (7-AAD). Преаналитический этап работы

проведен в соответствии с протоколом «Flow cytometry (FACS) staining protocol (Cell surface staining)» Yale Flow Cytometry. Выполнение аналитического этапа работы осуществлялось на проточном цитометре BD FACSCanto™ II.

Анализ генетических механизмов ответа на ионизирующее излучение.

Выбор генов-кандидатов. Для определения функциональных аннотаций генов и выявления их участия в биологических процессах использовался анализ данных из базы данных UniProt.

Разработка и синтез праймеров. Биоинформатический поиск информации о целевых генах производился в базах данных NCBI Gene и GenBank. Дизайн праймеров осуществлялся с использованием формата FASTA. Оптимизацию праймеров проводили согласно алгоритму поиска BLAST. Синтез олигонуклеотидов выполнен компанией ЗАО «Евроген».

Выделение РНК. Для выделения РНК использовался коммерческий набор RNA Solo. Процедура выделения РНК проводилась в соответствии с рекомендациями производителя, изложенными в прилагаемом протоколе. Количественная оценка концентрации и чистоты выделенной РНК осуществлялась с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000.

Проведение 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). Для нормализации данных экспрессии был использован ген *GAPDH* в качестве внутреннего контроля.

Анализ белок-белковых взаимодействий (ББВ). Для определения ББВ был использован ресурс STRING. Построение и визуализацию сети белок-белковых взаимодействий проводили с использованием Cytoscape 3.10.3. Последующий анализ узлов (на основе степени связности) выполняли при помощи встроенного плагина CytoNCA версии 2.1.6.

Биоинформатический анализ Gene Ontology (GO) и KEGG. Гены классифицировали согласно иерархической системе GO по категориям молекулярных функций, биологических процессов и клеточных компонентов. На следующем этапе с целью идентификации ключевых метаболических и сигнальных путей был применён анализ обогащения на основе данных KEGG с помощью программного обеспечения ShinyGO.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с использованием U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$). Анализ выживаемости выполнен в OriginPro 8 и Excel 2019. Экспрессия генов, определенная методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, нормализовалась по *GAPDH* и представлена в виде медианных значений с box-plots как среднее трёх повторов и анализировалась в Excel 2019 (тест Шапиро-Уилка на нормальность). Изменения экспрессии (FC) считались значимыми при $FC \geq |2|$. Корреляционный анализ (Спирмена, $p < 0,05$) проводился в SPSS Statistics 26.

Глава 3. Результаты и обсуждение

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

В настоящем разделе представлен анализ радиобиологических эффектов действия γ -излучения (^{60}Co , $E_{\text{ср}} = 1,25 \text{ МэВ}$), ионов ^{12}C (455 МэВ/нуклон, ЛПЭ в пике 120-140 кэВ/мкм), протонов (энергия 100 МэВ) и химиопрепарата доксорубицина (концентрация 0,004 мг/мл) на клеточные линии различного гистогенеза: MCF-7, HeLa, HUH-7, SK-N-BE(2) и hTERT.

Рисунок 1 демонстрирует кривые выживаемости опухолевых клеток линии MCF-7 в зависимости от дозы облучения.

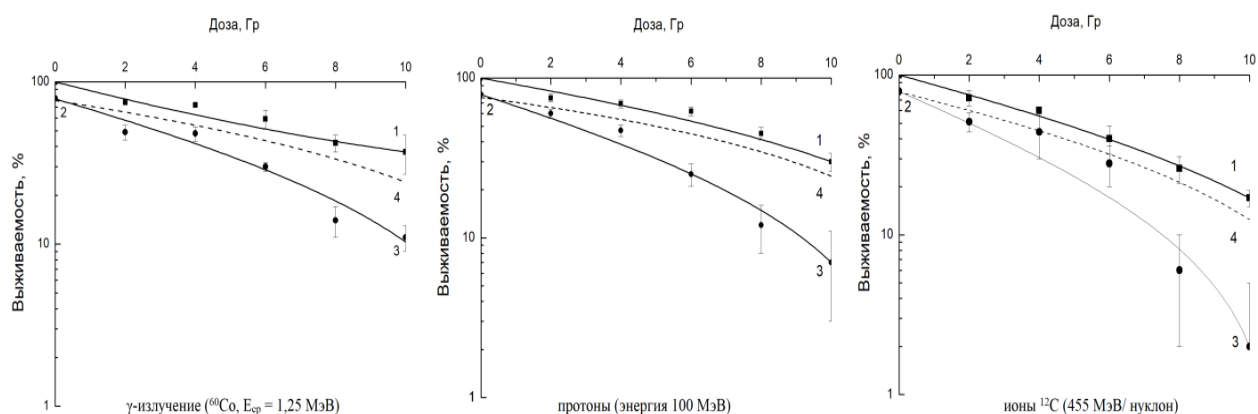


Рисунок 1 – Кривые зависимости выживаемости клеток линии MCF-7 от дозы: 1 – выживаемость клеток после действия ионизирующего излучения, 2 – действие доксорубицина, 3 – выживаемость клеток после комбинированного действия ионизирующего излучения и химиопрепарата, 4 – теоретическая кривая, ожидаемая при независимом сложении эффектов от ионизирующего излучения и препарата доксорубицина.

Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Исследование выявило гетерогенность взаимодействия доксорубицина с различными типами ионизирующего излучения в зависимости от клеточной линии. Так, воздействие ионов ^{12}C продемонстрировало более выраженный синергический эффект в клетках линии MCF-7, по сравнению с γ -излучением, а также протонами: $1,78 \pm 0,06$ против $1,48 \pm 0,10$ и $1,57 \pm 0,03$ соответственно.

На основе полученных кривых выживаемости клеток была рассчитана ОБЭ различных типов излучения. 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 – $2,56 \pm 0,49$.

Оценка пролиферативной активности клеточных популяций

На рисунке 2 представлены результаты количественного анализа времени удвоения популяций клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7. Точка 1 на графике соответствует контрольной группе, точка 2 отображает влияние доксорубина, точка 3 характеризует пролиферативную активность клеток после действия ионизирующего излучения, а точка 4 иллюстрирует эффекты комбинированного применения доксорубина и ионизирующего излучения.

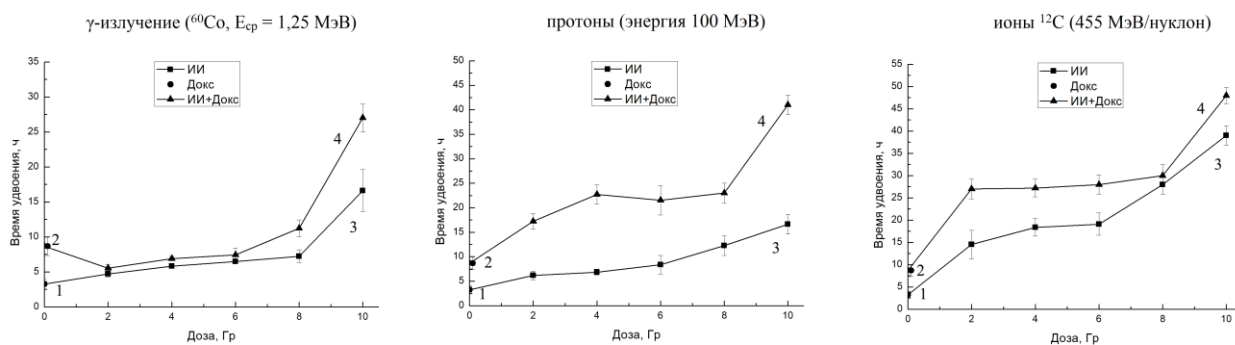


Рисунок 2 – Показатели времени удвоения для клеток линии MCF-7. Различия достоверны при уровне статистической значимости при $p < 0,05$

Исходя из полученных данных, максимальный показатель задержки клеточного цикла для клеток линии MCF-7 при действии γ -излучения составил 27 ч, протонов – 41 ч, ионов ^{12}C – 48 ч.

Наблюдаемое существенное пролонгирование времени удвоения клеток характерно при облучении в дозе 10 Гр, как в условиях комбинированного воздействия, так и при изолированном действии ионизирующего излучения. Данный эффект обусловлен радиационно-индуцированным повреждением ДНК и последующей активацией контрольных механизмов клеточного цикла (включая фазы G1/S и G2/M), что приводит к ингибированию клеточного деления. Кинетика пролиферации характеризовалась более заметным увеличением времени удвоения при комбинированном действии по сравнению с монотерапией ионизирующим излучением. Это может быть связано с синергическим эффектом двух агентов, усиливающих повреждение ДНК и вызывающих более значительный ответ со стороны механизмов контроля клеточного цикла.

Анализ метаболической активности клеток

Оценка метаболической активности осуществлялась с помощью МТТ-теста. Полученные результаты визуализированы с помощью графиков QQ-plot и представлены на рисунке 3.

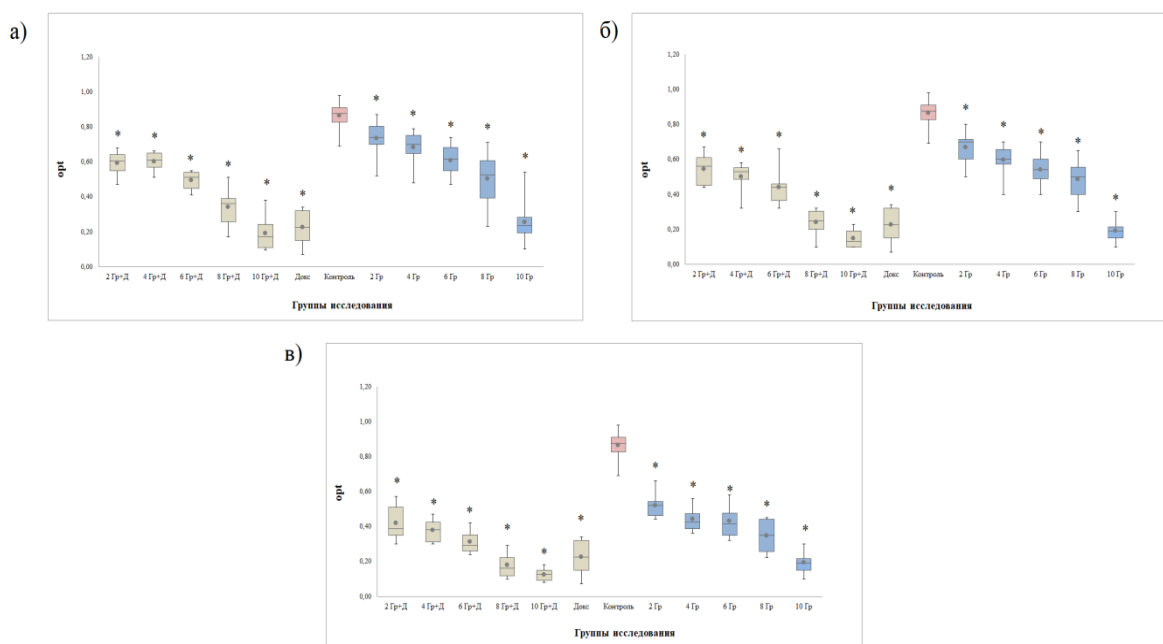


Рисунок 3 – Сравнение оптической плотности клеток линии MCF-7:
 а) – γ -излучение; б) – протоны; в) – ионы ^{12}C
 (* – достоверное отличие от контроля при $p < 0,05$)

Выявлено дозозависимое ингибирование пролиферации клеток линии MCF-7 в случае комбинированного действия доксорубицина и ионизирующего излучения, выраженное снижением оптической плотности (opt) относительно контрольной группы (показатель оптической плотности составил 0,86). Экспериментальные данные отражают наибольший цитотоксический потенциал ионов ^{12}C , что количественно выразилось в снижении оптической плотности до 0,18 при облучении в дозе 10 Гр. В сравнении с γ -излучением, облучение протонами в эквивалентной дозе также приводило к более выраженному подавлению пролиферативной активности клеток. В свою очередь, действие химиопрепарата также характеризуется выраженной цитотоксичностью (показатель оптической плотности – 0,34).

Сравнение клеточных линий по выраженности радиобиологических эффектов

Выраженность проявления радиобиологических эффектов оценивали, основываясь на 5-балльной шкале ранжирования. Ранг 1 соответствовал максимальной радиочувствительности (минимальная выживаемость, максимальное время удвоения, минимальная метаболическая активность), ранг 5 – максимальной радиорезистентности.

На рисунке 4 графически представлены результаты ранжирования, отражающие чувствительность к доксорубину (Докс), радиочувствительность клеточных линий по показателям выживаемости, времени удвоения (тудв), метаболической активности (МТТ).

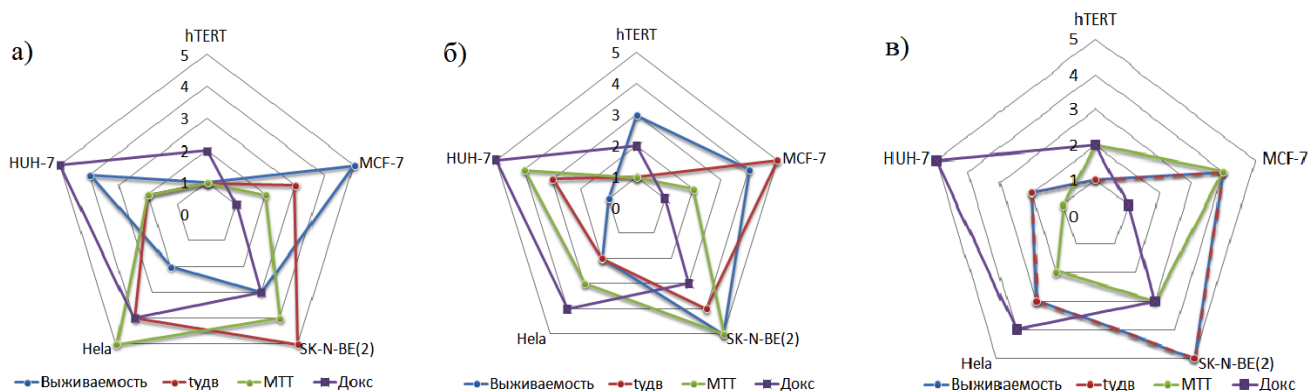


Рисунок 4 – Результаты ранжирования, отражающие радиочувствительность клеточных линий исходя из характера радиобиологического ответа:

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

Оценка чувствительности клеточных линий к доксорубину выявила, что клетки линии MCF-7 более чувствительны к препарату (ранг 1), чем клетки линии hTERT (ранг 2). Клетки линии hTERT демонстрировали наибольшую чувствительность к действию протонов и ионов ^{12}C (клоногенная активность, ранг 1), к действию γ -излучения – промежуточную (ранг 3). По показателю времени удвоения (пролиферативная активность) клетки линии hTERT при действии всех видов излучения занимают ранг 1, а по показателю метаболической активности (МТТ) являются наиболее чувствительными к действию ионов ^{12}C и γ -излучению (ранг 1), при действии протонов им присвоен ранг 2.

Клетки линии MCF-7 продемонстрировали выраженную резистентность к действию γ -излучения и протонам (ранг 4), а также к ионам ^{12}C (ранг 5), проявляющуюся в минимальном снижении клоногенной активности. Результаты показали наиболее выраженное подавление метаболических процессов в линии MCF-7 при облучении как γ -излучением, так и ионами ^{12}C (ранг 1). Клетки линий HeLa и HUH-7 показали сходный ответ на действие протонов (ранг 3 и 2 соответственно). Среди исследованных клеточных линий наибольшую устойчивость к воздействию как γ -излучения, так и протонов продемонстрировали клетки нейробластомы линии SK-N-BE(2). Данный фенотип радиорезистентности находит отражение в высоких ранговых позициях по критериям скорости пролиферации (время удвоения), выживаемости и клеточному метаболизму (результаты МТТ-теста).

Исходя из вышеизложенного, клетки линии MCF-7 обладают наибольшей чувствительностью к цитостатическому действию химиотерапевтического агента, а также демонстрируют максимальное подавление метаболической активности в ответ на облучение как ионами ^{12}C , так и γ -излучением. Напротив, клетки нейробластомы линии SK-N-BE(2) продемонстрировали выраженную радиорезистентность к воздействию различных типов ионизирующего излучения. На основании выявленных различий в чувствительности к доксорубину и ионизирующему излучению

дальнейшие исследования были сфокусированы на клеточных линиях MCF-7 и SK-N-BE(2).

Анализ выживаемости методом проточной цитометрии

В рамках исследования была проведена оценка жизнеспособности клеток методом проточной цитометрии. Каждая группа была разделена на четыре подгруппы: контрольную, обработанную доксорубицином, облучённую дозой 4 Гр и подвергнутую комбинированному действию двух факторов. В качестве примера мы демонстрируем данные выживаемости клеток линии MCF-7, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – 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 ± 1,71*
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 доксорубицина при $p < 0,05$

Установлено, что воздействие на клетки химиотерапевтического агента в концентрации 0,004 мг/мл вызывает статистически значимое снижение выживаемости, достигающее 4,90% по сравнению с контрольной группой, что согласуется с ключевым механизмом действия доксорубицина. Действие ионизирующего излучения демонстрировало цитотоксический эффект, зависимый от ЛПЭ излучения: протоны и ионы ^{12}C значительно снижали выживаемость на 16,30% и 20,50% соответственно. Комбинированное действие доксорубицина и ионизирующего излучения продемонстрировало синергический эффект, наиболее выраженный при использовании протонов (снижение выживаемости на 24,30%, $p < 0,05$ по сравнению с протонами) и ионов ^{12}C (снижение выживаемости клеток на 30,10%, $p < 0,05$).

Анализ генов-кандидатов, вовлеченных в регуляцию апоптоза

Для комплексного анализа регуляции апоптоза в данной работе исследована экспрессия генов семейства Bcl-2, представленного как антиапоптотическими, так и проапоптотическими белками. Были выбраны гены *BIRC5* и *PMAIP1*, кодирующие соответственно антиапоптотический белок Survivin и проапоптотический белок Noxa.

Биоинформатический анализ. Анализ белок-белковых взаимодействий

Моделирование сети белок-белковых взаимодействий выполнено с привлечением ресурса STRING. Визуализация и топологический анализ построенной сети осуществлены с использованием платформы Cytoscape. (рисунок 5).

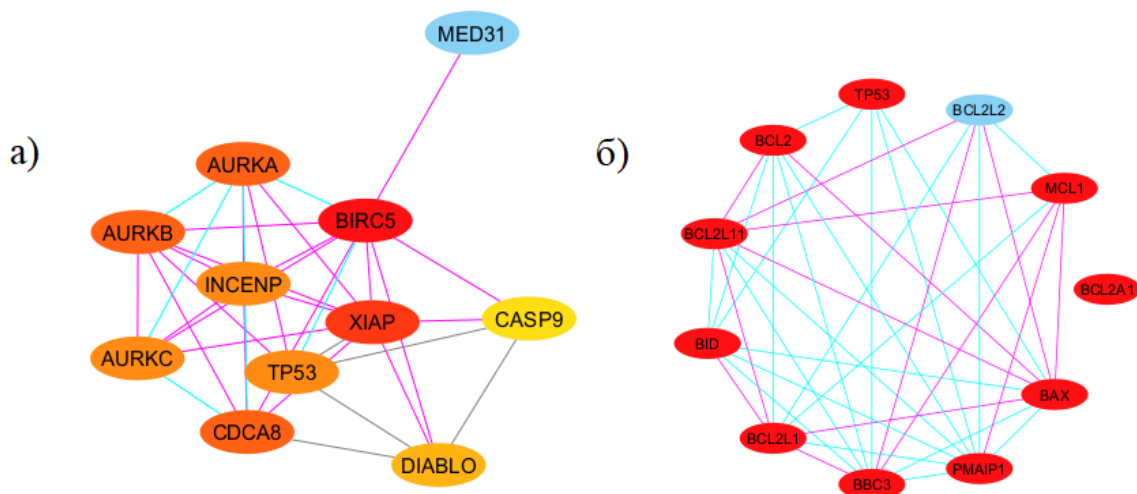


Рисунок 5 – Сеть ББВ для: а) – *BIRC5*; б) – *PMAIP1*

На основе проведенного анализа для каждого белка-кандидата был определен спектр вероятных белков-партнеров. Установлено, что белок *BIRC5* может быть функционально связан с *Med31*, *Aurka*, *Aurkb*, *Aurkc*, *Incenp*, *Xiap*, *Cas9*, *Trp53*, *Cdca8* и *Diablo*. В свою очередь, для белка *PMAIP1* предсказана связь с *Trp53*, *Bcl2*, *Bcl2l11*, *Bid*, *Bcl2l1*, *Bbc3*, *Bax*, *Bcl2a1*, *Mcl1* и *Bcl2l2*.

Анализ GO, систематизирующий гены по их молекулярным функциям, участию в клеточных процессах и локализации, указал на центральные функции исследуемых генов. Результаты анализа выявили ключевую роль гена *PMAIP1* в процессах митохондриально-опосредованного апоптоза, контроле точек клеточного цикла и механизмах восстановления целостности ДНК. В свою очередь, для гена *BIRC5* установлена его критическая функция в сборке и поддержании структуры митотического веретена, что является необходимым условием для точной сегрегации хромосом во время деления клетки. GO-анализ клеточных компонентов подтвердил участие *PMAIP1* в регуляции апоптоза через комплекс белков *Bcl-2* и его локализацию на митохондриальных и других мембранах. Ассоциация *BIRC5* с компонентами митотического веретена подтверждает его роль в митозе и цитокинезе. Анализ молекулярных функций выявил, что *PMAIP1* взаимодействует с ВН-доменами и регулирует стабильность белков-мишеней, в то время как *BIRC5* взаимодействует с киназами, модулируя их активность и связывание с шаперонами.

Результаты разработки праймеров для ПЦР-РВ

Олигонуклеотидные последовательности, использованные в настоящем исследовании, были определены *in silico* с применением алгоритма Primer-BLAST. Полный список праймеров с указанием их нуклеотидных последовательностей и соответствующих целевых генов представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Последовательности праймеров для оценки экспрессии генов

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

Анализ экспрессии генов

На данном этапе эксперимента оценивалась экспрессия генов *BIRC5* и *PMAIP1*. Каждая группа разделена на четыре подгруппы: контрольную, обработанную доксорубицином, облучённую в дозе 4 Гр и подвергнутую комбинированному действию.

На рисунке 6 представлены уровни экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках линии MCF-7 после воздействия исследуемых групп факторов.

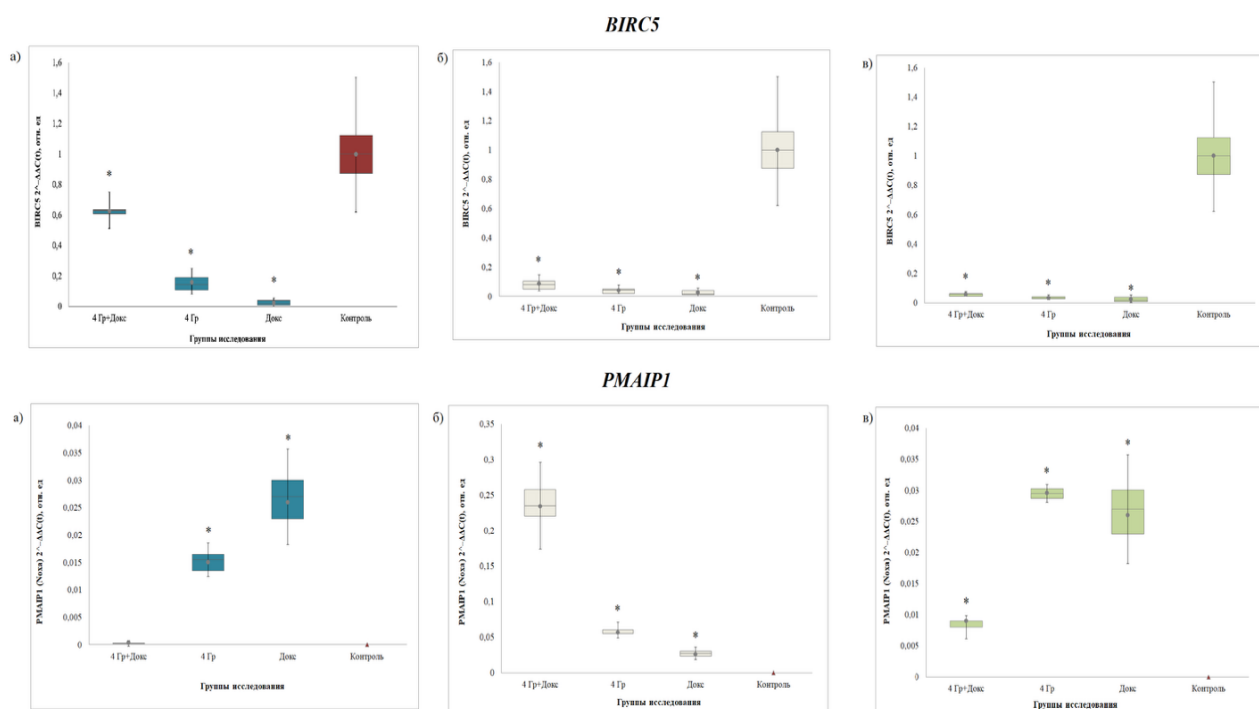


Рисунок 6 – Экспрессия генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках MCF-7:
а) – протоны; б) – γ -излучение; в) – ионы ^{12}C

Продемонстрировано, что в клетках контрольной группы регистрировалась конститутивная экспрессия *BIRC5* (1,00), что типично для опухолевого фенотипа, при одновременном отсутствии детектируемой экспрессии гена *PMAIP1* (0,00). Наблюдаемое под действием доксорубина подавление экспрессии гена *BIRC5* на фоне активации гена *PMAIP1* является молекулярным отражением его механизма действия, направленного на индукцию повреждений ДНК и последующем запуске апоптоза.

Установлено, что ионизирующее излучение оказывает статистически значимое ингибирующее действие на экспрессию *BIRC5*: для γ -излучения, протонов и ионов ^{12}C значения составили 0,04, 0,16 и 0,04 соответственно.

Выявлено, что комбинированное действие химического агента и ионизирующего излучения (γ -излучение, ионы ^{12}C) частично нивелировало подавление экспрессии исследуемого антиапоптотического гена (0,09 и 0,04 соответственно). В то же время комбинированное действие химиопрепарата и корпускулярного излучения (протонов) индуцировало выраженную активацию гена *BIRC5* (0,63), значительно превышающую уровень воздействия только протонов (0,16).

Наиболее выраженная активация транскрипции проапоптотического гена (0,20), регистрировалась при комбинированном применении цитостатика с γ -излучением, тогда как в случае комбинированного действия с ионами ^{12}C или протонами экспрессия проапоптотического гена не продемонстрировала существенного роста. В то же время воздействие протонов индуцировало слабую активацию экспрессии данного гена, соответствующую уровню 0,02.

Проанализированные значения кратности изменений (FC) транскрипционной активности генов отражены в таблице 3.

Таблица 3 – 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	<i>BIRC5</i>	1,00	-64,00*	-25,00*	-10,08*
	<i>PMAIP1</i>	0,0001	-40,32*	-16,00*	-5,04*
^{12}C	<i>BIRC5</i>	1,00	-64,00*	-25,40*	-16,00*
	<i>PMAIP1</i>	0,0001	-40,32*	-32,00*	-80,63*
Протоны	<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 $\text{FC} \geq |2|$

Экспериментально показано, что антибиотик антрациклинового ряда вызывает снижение экспрессии антиапоптотического гена (FC = -64,00) в клетках MCF-7. Облучение клеток протонами привело к подавлению экспрессии анализируемого гена (FC = -6,35), при этом данный эффект оказался менее значительным. В результате комбинированного действия химиопрепарата и протонов было зафиксировано незначительное снижение экспрессии 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.

Облучение клеток MCF-7 γ -излучением в дозе 4 Гр вызывало значительное снижение экспрессии *BIRC5* (FC = -25,00). Количественный анализ показал, что минимальная степень ингибирования экспрессии исследуемого антиапоптотического гена (FC = -10,08) регистрировалась в случае комбинированного действия химиопрепарата и гамма-излучения.

Значительное снижение уровня экспрессии гена *BIRC5* подтверждает проапоптотический эффект как доксорубицина (FC = -64,00), так и действия ионов ^{12}C (FC = -25,40) в культуре клеток MCF-7.

Изменения в экспрессии проапоптотического гена наблюдались как при монотерапии доксорубицином, так и при облучении ионами ^{12}C . Однако комбинированное действие этих агентов индуцировало синергический эффект, проявляющийся в выраженном снижении уровня экспрессии *РМАIP1* (FC = -80,63). Представляется вероятным, что данный феномен связан с активацией апоптотического каскада, в котором снижение уровня проапоптотического белка Noxa является одним из критических этапов.

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 4.

Таблица 4 – 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>	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>	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>PMAIP</i>	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 свидетельствуют о наличии статистически достоверных многофакторных зависимостей, связывающих транскрипционный профиль ключевых генов апоптоза с функциональными характеристиками клеток линии MCF-7.

Установлено, что значимое положительное корреляционное соотношение, связывающее уровень экспрессии антиапоптотического гена с параметром клоногенной активности, было зафиксировано лишь для экспериментальной группы, подвергнутой комбинированному действию антибиотика антрациклинового ряда и γ -излучения ($R = 0,918$, $p = 0,028$). Данный результат свидетельствует о сильной прямой взаимосвязи, при которой увеличение экспрессии *BIRC5* ассоциировано с повышением клоногенного потенциала клеток линии MCF-7 в условиях комбинированного действия указанных цитотоксических агентов.

Статистически значимая положительная корреляция между экспрессией гена *BIRC5* и метаболической активностью обнаружена в группе воздействия доксорубина ($R = 0,928$, $p = 0,028$).

В отличие от *BIRC5*, экспрессия гена *PMAIP1* демонстрировала обратную корреляцию с клеточными параметрами. Примечательно, что при комбинированном действии химиотерапевтического агента и протонного излучения была выявлена выраженная отрицательная корреляция ($R = -0,921$, $p = 0,026$) между уровнем экспрессии проапоптотического гена и клоногенной активностью клеток аденокарциномы протоков молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что чувствительность клеток линии MCF-7 достигает максимальной выраженности при комбинированном действии доксорубина 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 ген *BIRC5* играет центральную роль в процессах регуляции клеточного цикла и митоза.

4. Выявлено, что доксорубин 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 доксорубина и γ -излучения.

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

6. Установлена прямая зависимость между уровнем экспрессии генов *BIRC5* и *PMAIP1* в клетках SK-N-BE(2) и клоногенной активностью при комбинированном действии доксорубина и ионизирующего излучения (γ -излучения, ионов ^{12}C). Экспрессия гена *BIRC5* положительно коррелировала с эффектом комбинированного действия доксорубина 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 доксорубина.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мельникова, А.А.** Исследование комбинированного действия протонов и химиопрепарата доксорубицина на экспрессию генов BIRC5 (Survivin) и PMAIP1 (Noxa) в клетках линии MCF-7 / А.А. Мельникова, А.А. Афонин, Л.Н. Комарова, В.О. Сабуров // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 5-9. – DOI 10.33266/1024-6177-2025-70-4-5-9. – EDN AHUTWO.
2. **Мельникова, А.А.** Интегративный анализ экспрессии генов PMAIP1 и BIRC5, а также белок-белковых взаимодействий в клетках нейробластомы SK-N-BE(2) в условиях комбинированной терапии / А.А. Мельникова, А.А. Афонин, Л.Н. Комарова // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2025. – Т. 70, № 6. – С. 12-19. – DOI10.33266/1024-6177-2025-70-6-12-19. – EDN OPSLJN.
3. **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, С.В. Шкавров, Л.Н. Комарова // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2025. – Т. 34, № 1. – С. 128-136. – DOI 10.21870/0131-3878-2025-34-1-128-136. – EDN ETZOKC.
4. **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. – EDN VAFDMP.
5. 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 вузов. Ядерная энергетика. – 2021. – № 3. – С. 158-168. – DOI 10.26583/npe.2021.3.13. – EDN DZBHGQ.
6. Komarova, L.N. Investigation of the combined effect of ionizing radiation of different quality and doxorubicin on breast adenocarcinoma cells / L.N. Komarova, **A.A. Melnikova** // RAD Conference Proceedings. – 2021. – Vol. 5. – P. 100-103. – DOI 10.21175/RadProc.2021.19. – EDN FASXVH.
7. Komarova, L.N. Synergetic effects of the combined action of carbon ions and the chemotherapy drug doxorubicin on HeLa cancer cells / L.N. Komarova, **A.A. Melnikova**, D.A. Baldov // Nuclear Energy and Technology. – 2021. – Vol. 7, № 4. – P. 285-290. – DOI10.3897/nucet.7.78336. – EDN KXCZTH.