

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



Алхаддад Лина

**КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ И МУЛЬТИФОРМНОЙ
ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА**

Специальность: 1.5.1 – Радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

- Научные руководители**
- **Осипов Андреян Николаевич** – доктор биологических наук, профессор РАН.
 - **Леонов Сергей Викторович** – кандидат биологических наук, доцент.
- Официальные оппоненты**
- **Москалева Елизавета Юрьевна** – доктор биологических наук, профессор, зам. руководителя Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» по научной работе;
 - **Кофиади Илья Андреевич** – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства;
 - **Корякина Екатерина Владимировна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории радиационной биофизики Медицинского радиологического научного центра им. А. Ф. Цыба - филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «21» декабря 2022 г. в 13 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, ул. Ленинские горы, д. 1 стр. 10, ауд. 308. E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (Северин А.В. - учёный секретарь диссертационного совета МГУ.014.6); lina-alhaddad@hotmail.com (Алхаддад Лина - соискатель).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/499934708/>

Автореферат разослан «___» ноября 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета МГУ.014.6, кандидат химических наук



Северин А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) составляет 85% случаев рака легких [Goldstraw P., 2011], из них около 40% случаев являются неоперабельными [Parsons A., 2010], а 5-летняя общая выживаемость составляет всего около 15% [Goldstraw P., 2011]. Глиобластома (ГБМ) является наиболее распространенной первичной опухолью центральной нервной системы (ЦНС) у взрослых, на которую приходится около 50% всех глиом и 15% первичных опухолей головного мозга [Quinn T. Ostrom M.A., 2014]. Прогноз у пациентов с ГБМ неблагоприятный в онкологии, а средняя общая продолжительность жизни составляет около 15 - 17 месяцев [Gilbertá M. R., 2014]. Лучевая терапия (ЛТ) является одним из основных методов лечения пациентов с НМРЛ [Kaskowitz L., 1993] и ГБМ [Kazmi F., 2019]. Однако, устойчивость клеток НМРЛ и ГБМ к воздействию ионизирующего излучения (ИИ) остается существенным фактором, ограничивающим успешный терапевтический результат [Рябая О. О., 2019; Inda M. M., 2014].

Полагают, что одной из основных причин неудач в противоопухолевой терапии является присутствие в гетерогенной опухолевой ткани особых клеток, называемых опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) благодаря их молекулярно-клеточным характеристикам схожим с нормальными стволовыми клетками человека [Замулаева И. А., 2014]. ОСК обладают способностью к бесконечному самообновлению [Lathia J. D., 2015; Wolpert F., 2015; Young J. E., 2015], гипоксическим типом метаболизма, высокой эффективностью процессов репарации ДНК [Lathia J. D., 2015; Tabatabai G., 2011; Замулаева И. А., 2014] и подверженностью эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП).

В последнее время появились данные о том, что вступление опухолевых клеток в вызванное радиацией стресс-индуцированное преждевременное старение (stress-induced premature senescence или SIPS) может являться переходным механизмом, позволяющим клеткам выживать в условиях генотоксического стресса. Присутствие крупных атипических клеток, определяемых как полиплоидные гигантские опухолевые клетки (ПГОК) и многоядерные гигантские опухолевые клетки (МГОК), часто характеризуются высокой активностью ассоциированной со старением бета-галактозидазы и является одной из гистопатологических особенностей солидных опухолей [Kumar V., 2005], а появление ПГОК/МГОК в составе опухоли ассоциировано с высокой агрессивностью заболевания и плохим прогнозом [Siegal R., 2012; Zhang L., 2014]. Эти клетки позитивны в отношении маркеров ОСК, а их дочерние клетки характеризуются повышенной экспрессией мезенхимальных маркеров и транскрипционных факторов, регулирующих активность генов, ответственных за ЭМП [Zhang S., 2013; Fei F., 2015].

Понимание клеточных и молекулярных событий, лежащих в основе радиорезистентности и рецидива НМРЛ и ГБМ, затруднено из-за ограниченного доступа к резистентным клеткам от пациентов, подвергшихся ЛТ. В связи с этим выбора оптимальных режимов облучения и поиска прогностических маркеров (факторов) развития радиорезистентности клеток НМРЛ и ГБМ является актуальной и остаётся в настоящее время предметом активного научного поиска.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы является выявление и характеристика клеточно-молекулярных особенностей формирования адаптационного ответа на стресс, индуцированный ИИ, в клеточных линиях НМРЛ и ГБМ, имеющих различную радиационную устойчивость и наличие/отсутствие функционально активных генов-онкосупрессоров.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить и охарактеризовать фенотип сублиний клеток НМРЛ А549 (*p53* дикого типа) и Н1299 (*p53* дефицитные), выживших и поддерживающих устойчивый рост после фракционированного облучения в суммарной дозе 60 Гр;

2. Охарактеризовать клеточно-молекулярные особенности адаптационного ответа клеток полученных сублиний НМРЛ на стресс, индуцированный дополнительным облучением;

3. Провести сравнительный анализ молекулярных маркеров ЭМП в родительских и полученных изогенных сублиниях клеток НМРЛ;

4. Провести сравнительный анализ полиплоидии и уровней экспрессии связанного с FOS антигена-1 (FRA1) - белка транскрипционного комплекса AP-1, и транскрипционных факторов *p63/p73* - белков семейства *p53*, в тех же клеточных линиях;

5. Изучить клеточно-молекулярные эффекты, индуцируемые однократным облучением в дозах 2, 4 и 6 Гр в клетках ГБМ, имеющих наиболее распространенный набор мутаций в генах онко-супрессорах *TP53* и *PTEN*, а именно, клеточных линиях U87 (*TAp53wt/PTENmut*), LN229 (*TAp53mut/PTENwt*), U251 (*GOF p53mut/PTENmut*).

Научная новизна. В выживших после фракционированного облучения клетках НМРЛ впервые показана существенная взаимосвязь экспрессии маркеров ЭМП, полиплоидии и пролиферативной активности не только с режимом фракционированного облучения, но и с экспрессией *p63* и *p73*, транскрипционных факторов семейства *p53*. Впервые продемонстрировано, что облучение клеток ГБМ терапевтическими дозами ИИ изменяет экспрессию *p63* и *p73* в соответствии с наличием/отсутствием мутаций в генах *TP53/PTEN* этих клеток. Продемонстрировано, что формирование сенесцентных ПГОК/МГОК может быть одним из механизмов выживания клеток НМРЛ и ГБМ после ЛТ. Впервые показано, что режим фракционирования влияет на образование ПГОК преимущественно в клетках *TP53wt* НМРЛ, в то время как в отсутствие гена *TP53* увеличение доли ПГОК мало зависит от режима облучения. Полученные данные свидетельствуют о важности наличия дикого типа основного гена-онкосупрессора *TP53wt* и инактивирующих мутаций в другом основном гене-онкосупрессоре *PTENmut* для поддержания значительного количества сенесцентных ПГОК/МГОК в адаптационном ответе клеток различных линий ГБМ на однократное воздействие рентгеновского излучения в терапевтических дозах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полученные и охарактеризованные сублинии клеток НМРЛ А549 и Н1299, выжившие и поддерживающие устойчивый рост после фракционированного облучения в суммарной дозе 60 Гр, являются приемлимой моделью для изучения механизмов радиорезистентности.

2. Адаптационный ответ полученных сублиний НМРЛ на стресс, индуцированный дополнительным облучением, демонстрирует существенную взаимосвязь экспрессии маркеров ЭМП, полиплоидии и пролиферативной активности не только с режимом использованного фракционированного облучения, но и с экспрессией *p63* и *p73*, транскрипционных факторов семейства *p53*.

3. Наличие *TP53wt* и инактивирующих мутаций в другом основном гене-онкосупрессоре *PTENmut* ассоциировано с поддержанием значительного количества сенесцентных МГОК в адаптационном ответе клеток различных линий ГБМ на однократное воздействие рентгеновского излучения в терапевтических дозах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные указывают на необходимость определения наличия мутаций в генах белков семейства *p53* и *PTEN* в опухолевых клетках для правильного выбора наиболее эффективного режима

облучения. Работа имеет фундаментальное значение для понимания роли ПГОК/МГОК, клеточно-молекулярных механизмов и динамики их формирования и функционирования, а также молекулярных мишеней для терапевтического воздействия на ПГОК/МГОК и их дочерние клетки. Результаты работы открывают возможность увеличения эффективности радиотерапии путем разработки новых разновидностей адьювантной химиотерапии на основе ингибиторов SIPS (т.н. «сенолитиков»), протеасом и/или ВЕТ ингибиторов, нацеленных на обнаруженные нами сигнальные пути.

Методология и методы исследования. Теоретической и методологической основой диссертационной работы являются разработки отечественных и зарубежных ученых в области радиобиологии, молекулярной и клеточной биологии и биофизики. Информационную базу составляют статьи в периодических рецензируемых изданиях, материалы научных конференций, объекты интеллектуальной собственности, публикации в научных сборниках по исследуемой проблеме.

При проведении исследований были использованы: методы культивирования НМРЛ и ГБМ человека; метод фракционированного облучения клеток используя рентгеновскую установку для облучения культур клеток; метод проточной цитометрии для анализа клеточной полиплоидии и уровня экспрессии FRA1; метод Райт-Гимза для определения доли МГОК в клеточных популяциях; анализ роста колоний в мягком агаре «Soft Agar Colony Formation Assay» для оценки способности клеток к репопуляции после облучения; метод включения EdU для оценки ДНК-реплицирующей активности клеток в S-фазе клеточного цикла; метод МТТ для оценки активности клеток; «scratch-тест» для изучения миграционной способности опухолевых клеток после облучения; иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Ki67 и экспрессии N-кадгерина; вестерн-блоттинг для детекции белков, участвующих в ЭМП; «AlamarBlue тест» в мягком агаре для оценки митохондриальной метаболической активности клеток в колониях; анализ активности β -галактозидазы для оценки количества стареющих клеток; статистические методы обработки полученных данных.

Достоверность результатов работы обеспечивается проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью; корректной статистической обработкой полученных данных и необходимым количеством повторных исследований; сопоставлением результатов, полученных разными методами, а также сравнением с аналогичными результатами, полученными другими авторами. Положения и выводы, сформулированные в диссертации, прошли апробацию на международных и российских научных конференциях и семинарах. Достоверность также подтверждается публикациями результатов исследования в 4 рецензируемых международных научных изданиях, входящих в первый квартиль (Q1) Web of Science и Scopus.

Апробация работы Основные положения и полученные результаты диссертационной работы были доложены на следующих научных конференциях:

1. XVI Курчатовская междисциплинарная молодёжная научная школа, Москва, 2019 г.;
2. XXV ежегодная научная конференция ФИЦ ХФ РАН. Москва, 2020 г.;
3. V Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего - наука молодых», Москва, 2020 г.;
4. VIII конференция по радиационным исследованиям, г. Москва, 2021 г.;
5. Ninth International Conference on Radiation in Various Fields of Research. Herceg Novi. Montenegro, 2021 г.;
6. 64-я всероссийская научная конференция МФТИ, Москва, 2021 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в международных рецензируемых журналах первого квартиля (Q1) Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3х глав, заключения, выводов, списка использованных источников и благодарностей. Содержит 182 страниц машинописного текста, в том числе 22 рисунка. Библиография включает 370 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный следующим вопросам: 1) лучевая терапия немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) человека; 2) лучевая терапия мультиформной глиобластомы (ГБМ) человека; 3) гетерогенность и пластичность опухолевых клеток; 4) опухолевые стволовые клетки (ОСК) и их возможная роль в возникновении и прогрессировании опухолей; 5) перекрестные взаимодействия между ОСК и их нишами; 6) процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП); 7) основные механизмы репарации двуниевых разрывов ДНК и их роль в судьбе клетки; 8) радиационно-индуцированное преждевременное старение (сенесценция) опухолевых клеток; 9) роль полиплоидных/многоядерных гигантских опухолевых клеток (ПГОК/МГОК) в метастазировании и рецидиве после противоопухолевого лечения.

Из анализа литературы следует, что присутствие в гетерогенной опухолевой структуре популяций ОСК и ПГОК/МГОК представляет собой серьезную проблему, препятствующую успешной терапии пациентов с НМРЛ и ГБМ.

Глава 2. Материалы и методы.

Культивирование клеточных линий НМРЛ и ГБМ. Эксперименты были выполнены на культурах НМРЛ и ГБМ, полученных из АТСС. Клетки НМРЛ (A549 и H1299) культивировали в среде RPMI 1640. Клеточные линии ГБМ, имеющие набор классических онкогенных мутаций в генах-онкосупрессорах - 1) U87 (*TP53wt /PTENmut*); 2) LN229 (*TP53mut /PTENwt*) и 3) U251 (*GOF TP53mut /PTENmut*) (АТСС, США) - культивировали в среде DMEM.

Облучение. Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, при мощности дозы 0.85 Гр/мин, напряжении 200 кВ, токе 2×5 мА, фильтре 1,5 мм Al, и комнатной температуре. Погрешность отпускаемой дозы не превышала 10 %. Клетки НМРЛ A549 (*TP53* дикий-тип) и H1299 (*TP53*-дефицитные) облучали с применением двух режимов. Суммарная доза 60 Гр в режиме FDE (Fraction Dose Escalation) была разделена на несколько доз следующим образом: 10 фракций по 2 Гр, 4 фракции по 5 Гр и 2 фракции по 10 Гр. Для режима SF (Standard Fractionation) использовали 30 фракций по 2 Гр на фракцию. Родительские клетки A549 и H1299 поддерживали без облучения в тех же условиях в качестве контроля. После достижения общей дозы 60 Гр, клетки культивировали при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 недель для восстановления. Выжившие и устойчиво растущие клетки получили соответствующие названия - A549DE и H1299DE (после режима FDE) и A549S и H1299S (после режима SF). Эти клетки и клетки ГБМ линий U251, LN229 и U87 были дополнительно облучены рентгеновским излучением в клинически-релевантных однократных дозах 2, 4, 5 и 6 Гр при комнатной температуре для оценки изменений в ответе на воздействие рентгеновского излучения. Необлученные клетки использовали в качестве контроля.

Сортировка клеток Клетки инкубировали с антителами против CD133, конъюгированными с AlexaFluor® 488 (MAB4310X, Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия) и с моноклональными антителами против CD44 конъюгированными с PE (SAB4700187, Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия) 30 минут при 4 °С. Меченые клетки анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием сортировщика клеток BD FACSMelody™ (BD Life Sciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Чистота отсортированных популяций составляла 90%, что было подтверждено с помощью Amnis ImageStreamX Mark II Imaging Flow Cytometer (Luminex Corporation, Остин, Техас, США) и проанализировано с использованием шаблона анализа данных, созданного в IDEAS v6.2.

Анализ клеточной полиплоидии. ДНК экспоненциально растущих клеток окрашивали йодистым пропидием (PI) (0,5 мг/мл). Анализ содержания ДНК выполняли с помощью проточного цитометра BD FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, Сан-Хосе, Калифорния, США). Было проанализировано не менее 50 000 событий/образец, и доля полиплоидных клеток была оценена с помощью программного обеспечения BD CellQuest Pro 5.1 (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Клоногенный тест. Сразу после облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр клетки высевали на чашки Петри диаметром 60 мм и инкубировали в течение двух недель для образования колоний. Колонии фиксировали 100% метанолом в течение 15 минут при комнатной температуре с последующим окрашиванием по Гимзе в течение 15 минут. Подсчитывали только колонии, содержащие ≥ 50 индивидуальных клеток.

Эффективность колониеобразования (ЭК), т. е. соотношение числа колоний, образованных прикрепленными к пластику клетками, к числу посеянных клеток и клоногенная выживаемость (КВ) клеток рассчитывались по следующей формуле:

$$\text{ЭК \%} = \frac{\text{количество образованных колоний}}{\text{количество посеянных клеток}} \times 100 \% \quad (1)$$

$$\text{КВ} = \frac{\text{количество колоний образовавшихся после облучения}}{(\text{количество посеянных клеток} \times \text{ЭК необлученных клеток})} \quad (2)$$

Анализ независимого от прикрепления роста клеток в мягком агаре. Сразу после облучения клетки смешивали с 0,6 % агар-агаром. Смеси клетки/агар добавляли в 6-луночные планшеты. Дважды в неделю добавляли 100 мкл ростовой среды для предотвращения высыхания агара. После образования колоний (~ 21 день) их окрашивали 0,05% кристаллическим фиолетовым и подсчитывали вручную число колоний, содержащих ≥ 50 клеток, используя световой микроскоп.

Анализ пролиферации клеток с помощью EdU. Клетки культивировали в концентрациях $1,5 \times 10^3$ и 2×10^3 клеток/0,32 см² в 96-луночном планшете в течение 3 суток. Для оценки пролиферации клеток использовали коммерческий набор Click-iT™ EdU Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки визуализировали с помощью автоматизированной микроскопической системы высокого разрешения ImageXpress Micro XL (Molecular Devices LLC, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Иммунофлуоресцентное окрашивание Ki67 и N-кадгерина. Клетки высевали в 384-луночный планшет (Corning, NY, США) и затем клетки фиксировали с помощью 4%-го раствора параформальдегида в PBS (pH 7,4) в течение 15 минут при комнатной температуре, с последующими двумя промывками, пермеабиллизацией и блокировкой в 0,3% Triton X-100 в PBS (pH 7,4) с добавлением 2% BSA. Клетки инкубировали с первичными мышиными моноклональными антителами: к N-кадгерину (5D5) (1: 2000,

ab98952, Abcam, США) и к Ki67 (0,005 мг/мл, clone KiS5, Merck-Millipore, США), разведенными в PBS с 1% BSA и 0,3% Triton-X 100 в течение 1 часа при комнатной температуре и с соответствующими вторичными антителами: F(ab')₂-козы к мышинному IgG (H + L), Qdot 655 (1:50, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) и Alexa Fluor 488 (1:500, Merck-Millipore, Берлингтон, Вермонт, США), соответственно. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (разведение 6 мкг/мл, Thermo Fisher Scientific, США) при 4°C. Клетки анализировали с использованием системы скрининга высокого разрешения ImageXpress Micro XL (Molecular Devices LLC, Сан-Хосе, Калифорния, США), и интегрированную интенсивность флуоресцентного сигнала N-кадгерина и Ki67 на клетку рассчитывали с использованием программного обеспечения Cell Profiler 4.0.7 (Broad Institute, США).

Активность оксидоредуктаз (MTT тест). Клетки культивировали в 96-луночном планшете. В лунки вносили по 20 мкл рабочего раствора MTT (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США, конечная концентрация 0,5 мг/мл) для клеток НМРЛ - через 72 часа после посадки в планшеты, а для клеток ГБМ - через 72 часа после их облучения. Для растворения образованных кристаллов формазана добавляли 150 мкл/лунку раствора DMSO. Через 15 минут измеряли оптическую плотность каждой лунки при длине волны 570 нм с помощью микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия). Данные анализировали с использованием программного обеспечения для анализа данных MARS (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия).

Анализ миграционной активности с помощью теста «заживление раны» (wound healing model или «скретч-тест»). Клетки культивировали в 96-луночном планшете до достижения 90 % конfluence, после чего наносили царапину в середине монослоя с помощью стерильного наконечника микропипетки для имитации раневого пространства. Снимали изображения начальных царапин в нулевой момент времени ($t = 0$ ч) и через 24, 48 и 72 или 96 часов ($t = \Delta$ ч). Миграционную активность клеток оценивали с использованием системы скрининга ImageXpress Micro XL High-Content (Molecular Devices LLC, США). Скорость миграции измеряли с помощью программного обеспечения MetaXpress 5.0. Миграционная активность клеток была представлена как площадь заращения поверхности «раны» в % от исходной площади раны по следующей формуле:

$$\text{Площадь заращения раны, \%} = \frac{(A_{t=0\text{ h}} - A_{t=\Delta\text{ h}})}{A_{t=0\text{ h}}} \times 100 \% \quad (3),$$

где $A_{t=0\text{ h}}$ начальная площадь раны (мкм^2) сразу после нанесения царапины ($t = 0\text{ h}$), а $A_{t=\Delta\text{ h}}$ площадь раны (мкм^2), измеренная через 24, 48, 72 или 96 часов.

Вестерн-блоттинг. Лизаты клеточных культур получали с использованием буфера RIPA. Концентрацию белков определяли с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, США). Белки разделяли в 8 - 16% SDS-полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны блокировали в буфере Pierce™ (Thermo Scientific™, США) и инкубировали с первичным кроличьим поликлональным антителом против Виментина (1 мкг/мл, ab45939, Abcam, Кембридж, Массачусетс, США), E-кадгерина (клон EP700Y, 1: 1000, ab40772, Abcam, Кембридж, Массачусетс, США), p63 (1: 1000, ab124762, Abcam, Кембридж, Массачусетс, США) и p73 (1: 2000, ab40658, Abcam, Кембридж, Массачусетс, США) при 4 °C в течение ночи. После отмывки мембраны инкубировали с овечьими антителами против p-SAR IgG кролика (1: 5000, IMTEC, Москва, Россия) и овечьими анти-мышинными p-SAM IgG (1:

1000, ООО «ИМТЕК», Москва, Россия) в течение 2 часов при комнатной температуре. Реагент Clarity™ Western ECL Substrate использовали для хемилюминесцентного обнаружения белков. Окрашивание белков на мембране с помощью Ponceau S (0,1% Ponceau S и 5% уксусная кислота) выполняли для определения общей белковой нагрузки каждого трека и последующей нормализации люминесцентного сигнала каждого тестируемого белка. Изображения анализировали с помощью системы визуализации ChemiDoc™ MP (170 – 8280) (Bio-Rad, США).

Анализ экспрессии фактора транскрипции FRA1. После фиксации клеток в 4% растворе параформальдегида, пермеабелизовали, блокировали и инкубировали с моноклональными кроличьими антителами к FRA1, конъюгированными с Alexa Fluor® 488 (1: 500, клон EP4711, Abcam, США). Клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD FACScalibur (Becton Dickinson, США). Было проанализировано всего 50 000 событий/образец. Медиану интенсивности флуоресценции рассчитывали с помощью программного обеспечения BD Cell Quest Pro 5.1 (Becton Dickinson, США).

Анализ доли МГОК в клеточных популяциях. Клетки культивировали в 96-луночном планшете при концентрации 10^5 клеток/ $0,32 \text{ см}^2$. Через 24 часа после облучения клетки фиксировали в абсолютном метаноле в течение 5 минут, окрашивали раствором Райт-Гимзы в PBS (pH 6,6) в отношении 1:10 в течение 1 часа с последующей промывкой PBS (pH 6,6) и дистиллированной водой. Подсчёт среднего числа МГОК производили в пяти микроскопических полях зрения ($\times 100$). Для определения площади ядра (мкм^2) МГОК для каждой из линий использовался встроенный алгоритм автоматизированного подсчета, используя окрашивание ядер красителем Hoechst 33342 и последующий анализ флуоресцентного сигнала на клетку с помощью многопараметрического количественного анализа высокого разрешения на установке *ImageXpress Micro XL* (Molecular Devices LLC, США) и программного обеспечения MetaXpress 5.0.

Анализ метаболизма клеток в составе колоний - AlamarBlue-тест в мягком агаре. Сразу после облучения клеточные суспензии смешивали с 0,2% агар-агаром и вносили в лунки 96-луночного планшета, покрытые 0,3% агаром. Клетки инкубировали в стандартных условиях CO_2 -инкубатора (5% CO_2 , 37 C) в течение 7 дней, после этого в каждую лунку добавляли 10% реагента AlamarBlue (Invitrogen, Фредерик, Мэриленд). Флуоресценция реагента AlamarBlue определили с помощью CLARIOstar (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия) при длинах волн возбуждения/испускания 530/590 нм. Обработку полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения анализа данных MARS (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия).

Анализ ассоциированной со старением бета-галактозидазы (β -Gal). Детекцию активности ассоциированной со старением β -Gal (SA- β -Gal) (маркер фенотипа клеточного старения) проводили с использованием коммерческого набора для оценки клеточного старения «Cellular Senescence Assay Kit» (EMD Millipore KAA002, США) в соответствии с протоколом производителя.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.2.161 (GraphPad Software, San Diego, CA, США), STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, США) и EXCEL 2010 Software (Microsoft, Редмонд, Вашингтон, США). Результаты представлены как среднее трёх независимых экспериментов \pm стандартная ошибка. Статистическая значимость была проверена с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни. Уровни значимости обозначены звездочками: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Глава 3. Результаты

Изучение клеточно-молекулярных механизмов радиорезистентности было проведено с использованием двух *in vitro* моделей: 1) клетки НМРЛ человека, пережившие радиационный стресс в результате фракционированного облучения в терапевтически релевантных дозах и режимах; 2) клетки ГБМ человека, подвергшихся однократному воздействию терапевтически релевантными дозами рентгеновского излучения.

3.1 Фенотип и радиочувствительность клеток НМРЛ, выживших после фракционированного облучения с различными режимами.

Выжившие после фракционированного облучения клетки A549DE и A549S существенно не различались по адгезии от своих родительских клеток, хотя и демонстрировали более веретеновидную морфологию. Выжившие после фракционированного облучения клетки H1299DE и H1299S изменили морфологию, приобретая более выраженный мезенхимальный фенотип (округлую или веретенообразную форму) по сравнению с родительскими клетками, демонстрирующими обычный эпителиальный фенотип. Более того, эти клетки продемонстрировали потерю межклеточных контактов и увеличенное количество жизнеспособных округлых клеток с пониженной адгезией к пластику, что указывало на фенотипические признаки частичной активации в них программы ЭМП.

Эффективность колониеобразования (ЭК) клеток, выживших после фракционированного облучения, снижалась по сравнению с родительскими клетками вне зависимости от режима облучения и наличия в них функционально-активного *TP53* (результаты представлены в диссертации). Однако их радиочувствительность (классический тест на образование клеточных колоний в условиях адгезии к пластику в ответ на облучение дополнительными однократными дозами ИИ) значительно была связана как с режимом предшествующего облучения, так и с наличием в клетках функционально-активного *TP53*. Так, по сравнению с родительскими клетками, выжившие после режима FDE клетки *TP53wt* A549DE были более устойчивы к дополнительному облучению в дозах 2 и 4 Гр, тогда как клетки *TP53null* H1299DE оказались более радиочувствительными (Рис. 1 А). Режим SF вызывал увеличение радиорезистентности клеток *TP53wt* A549S к дополнительному облучению в дозах 2, 4 и 6 Гр (Рис. 1 Б), тогда как *TP53null* H1299S клетки были более устойчивы к дополнительному облучению в дозах 2 и 4 Гр, по сравнению с родительскими клетками. Эти результаты могут указывать на значительную связь наличия функционально-активного *TP53* с радиочувствительностью опухолевых клеток независимо от режима фракционирования дозы. С другой стороны, режим фракционирования дозы может существенно модулировать радиочувствительность *TP53null* НМРЛ клеток, что предполагает связь эффективности режима фракционирования и экспрессии других белков семейства p53.

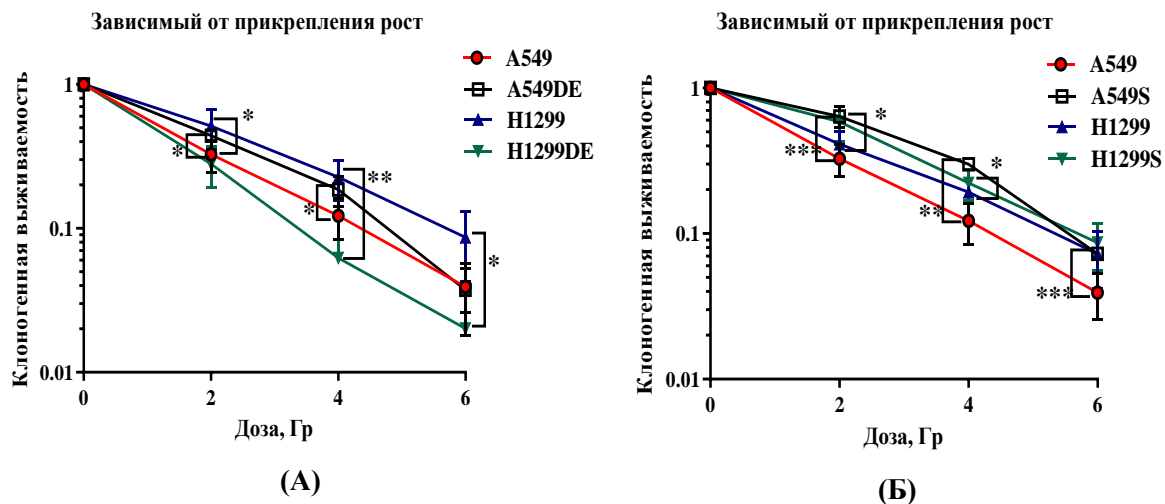


Рисунок 1. Клоногенная выживаемость родительских клеток и клеток выживших после фракционированного облучения с режимами FDE (А) и SF (Б).

3.2 Влияние режима фракционирования на способность клеток НМРЛ к репопуляции после облучения

Не зависящий от прикрепления к субстрату рост опухолевых клеток является отличительной чертой их резистентности к разновидности апоптоза, называемой аноиксисом (anoikis), регулируемым адгезией к субстрату, и является первым шагом к метастазированию опухоли. Клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются плохо изученными. Морфологические изменения клеток H1299DE и H1299S могут влиять на их зависимый от прикрепления к субстрату рост и способность образовывать колонии на твердой поверхности, что может привести к снижению ЭК выживших после облучения клеток. Чтобы оценить, обладают ли выжившие после фракционированного облучения сублинии способностью к независимому от прикрепления к субстрату росту – характерной чертой злокачественно-трансформированных клеток, обеспечивающей склонность к репопуляции и метастазированию, мы проводили анализ роста клеток в мягком агаре после облучения их дополнительными однократными дозами ИИ. ЭК при независимом от прикрепления росте облученных (за исключением дозы 6 Гр) родительских сублиний существенно не различалась.

Облучение в режиме SF существенно не влияло на клоногенную выживаемость клеток *TP53wt* A549S, за исключением статистически значимого увеличения выживаемости после тестирующего облучения в дозе 2 Гр (Рис. 2 Б), тогда как облучение с режимом FDE приводило к повышению выживаемости клеток A549DE (Рис 2 А). Оба режима вызвали общую более высокую дозозависимую клоногенную выживаемость клеток *TP53null* H1299DE и H1299S, указывая на увеличение их радиорезистентности по сравнению с их родительскими клетками H1299 (Рис. 2). Таким образом, независимо от наличия функционально-активного *TP53*, режим FDE повышал склонность к репопуляции (клоногенную выживаемость в условиях независимого от прикрепления роста клеток), выживших после фракционированного облучения, тогда как облучение в режиме SF имело аналогичный эффект только для *TP53null* клеток.

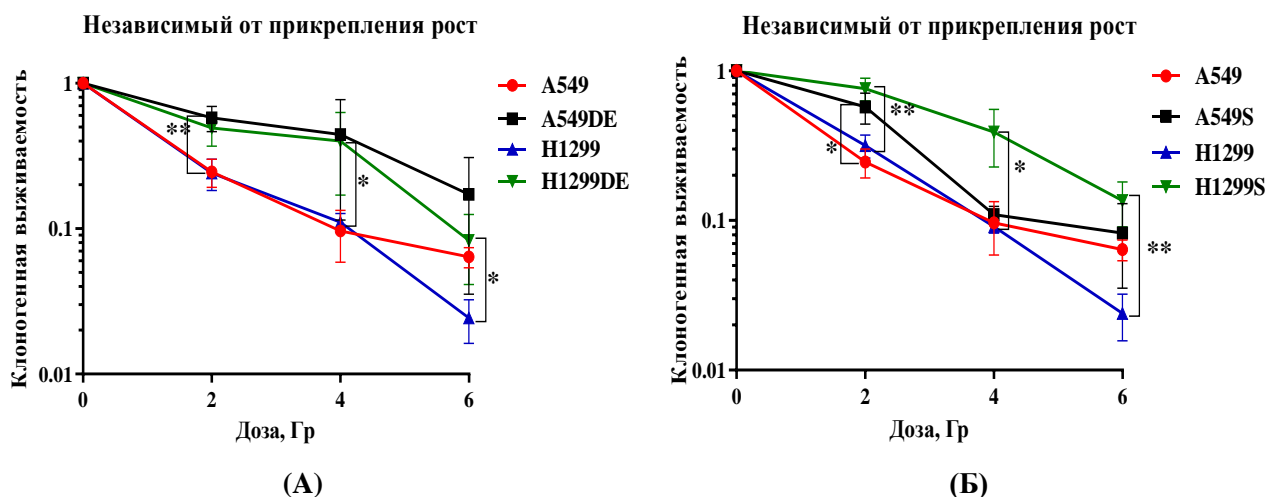


Рисунок 2. Клоногенная выживаемость при независимом от прикрепления росте родительских клеток и их сублиний, выживших после фракционированного облучения с режимами FDE (А) и SF (Б).

3.3 Изменение пролиферативной и активности оксидоредуктаз в клетках НМРЛ в ответ на облучение

В популяциях клеток А549 с *p53* дикого типа, выживших после фракционированного облучения в режиме SF, отмечалось статистически значимое снижение фракции ДНК-реплицирующих клеток (Рис. 3 А), а после облучения в режиме FDE снижение и активности оксидоредуктаз (Рис. 3 Б). В целом оба режима облучения вызвали в этих клетках однонаправленные изменения: снижение пролиферативной активности и активности оксидоредуктаз. Напротив, в случае *p53* дефицитных клеток Н1299 в зависимости от режима облучения отмечались разнонаправленные изменения: облучение в режиме FDE приводило к снижению пролиферативной активности (Рис. 3 А) и активности оксидоредуктаз (Рис. 3 Б), тогда как облучение в режиме SF напротив увеличивало пролиферативную активность и активность оксидоредуктаз выживших клеток (Рис. 3 А и Б, соответственно).

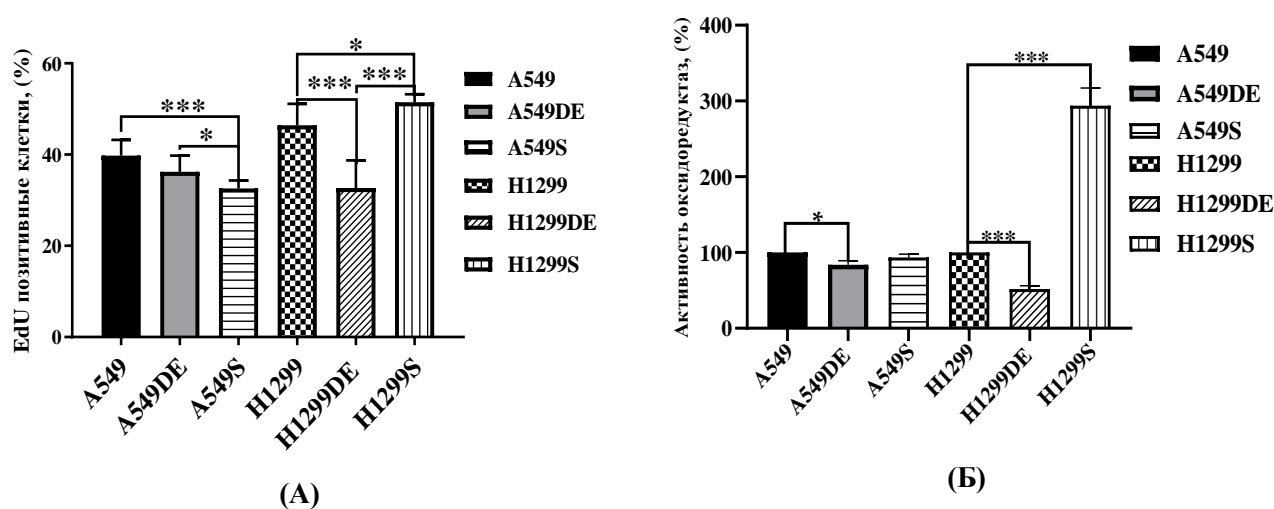


Рисунок 3. Оценка пролиферативной (EdU анализ) (А) и активности оксидоредуктаз (МТТ-тест) (Б) активности как родительских (необлученных) клеток А549 и Н1299, так и выживших клеток после FDE (А549DE и Н1299DE) и SF (А549S и Н1299S) режимов облучения.

3.4 Проллиферативная активность в изолированных популяциях клеток НМРЛ, имеющих ОСК-маркеры

Изучение соотношения интегрированной интенсивности EdU- и Ki67-связанной флуоресценции, одновременно измеренные в ядрах тех же облученных по сравнению с необлученными клетками, показало, что большинство популяций облученных линий A549S и H1299S вышло из клеточного цикла и накопилось в предположительно покоящихся популяциях, демонстрирующих чрезвычайно низкую интенсивность флуоресценции, связанную с EdU и Ki67 через 24 часа после облучения (данные представлены в диссертации). Значительно меньшая, предположительно активная в клеточном цикле и пролиферирующая субпопуляция этих клеток продемонстрировала повышенную линейно связанную интенсивность флуоресценции, большую, чем у необлученных клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что фракции клеток A549, выходящих из клеточного цикла и вновь вступающих в него, были намного меньше, чем в клетках H1299, CD44+ фракция которых, вероятно, чаще выходила из «спящего» состояния через 48 часов после воздействия облучением в дозе 5 Гр.

3.5 Влияние режимов фракционированного облучения на активацию программы ЭМП и 1D миграцию выживших клеток НМРЛ

По сравнению с SF режимом, фракционированное облучение в FDE режиме вызывало более выраженное снижение экспрессии E-кадгерина (маркера эпителиального фенотипа) в выживших *p53wt* A549 клетках (Рис. 4 А). Оценить экспрессию этого эпителиального маркера в клетках H1299 не представлялось возможным, поскольку эта клеточная линия не экспрессирует E-кадгерин эндогенно.

Облучение в режиме FDE статистически значимо увеличивало экспрессию Виментина (мезенхимального маркера) в клетках H1299DE, вызывая лишь незначительное увеличение его экспрессии в клетках A549DE (Рис. 4 Б). Интересно, что тот же режим модулировал обратным образом экспрессию другого мезенхимального маркера, N-кадгерина: увеличивал его экспрессию в клетках A549DE и подавлял в H1299DE клетках (Рис. 4 В). Облучение в режиме SF вызвало статистически значимое снижение экспрессии Виментина в клетках A549S, тогда как H1299S статистически значимых изменений не было зарегистрировано. Тот же режим приводил к статистически значимой активации экспрессии N-кадгерина в клетках A549S и незначительному подавлению его активности в клетках H1299S. Эти данные указывают на то, что режим FDE вызывает частичную активацию программы ЭМП в клетках НМРЛ, переживших облучение, либо за счет активации Виментина в *TP53null* клетках, либо за счет aberrантной активации N-кадгерина в клетках *TP53wt*. Режим SF, вероятно, в меньшей степени влияет на активацию ЭМП независимо от наличия *p53* в выживших после облучения клетках НМРЛ.

Режим SF не оказывал значительного влияния на «1D» горизонтальную миграцию выживших после облучения клеток, хотя и несколько облегчал их миграцию через 24 часа после нанесения «царапины» (Рис. 4 Д). Напротив, режим FDE замедлял миграцию выживших клеток: A549DE до 72 часов и H1299DE до 48 часов (Рис. 4 Г). Эти данные показывают, что режим фракционированного облучения в большей степени чем наличие *TP53* влияет на 1D ограниченное миграционное поведение выживших после облучения клеток НМРЛ.

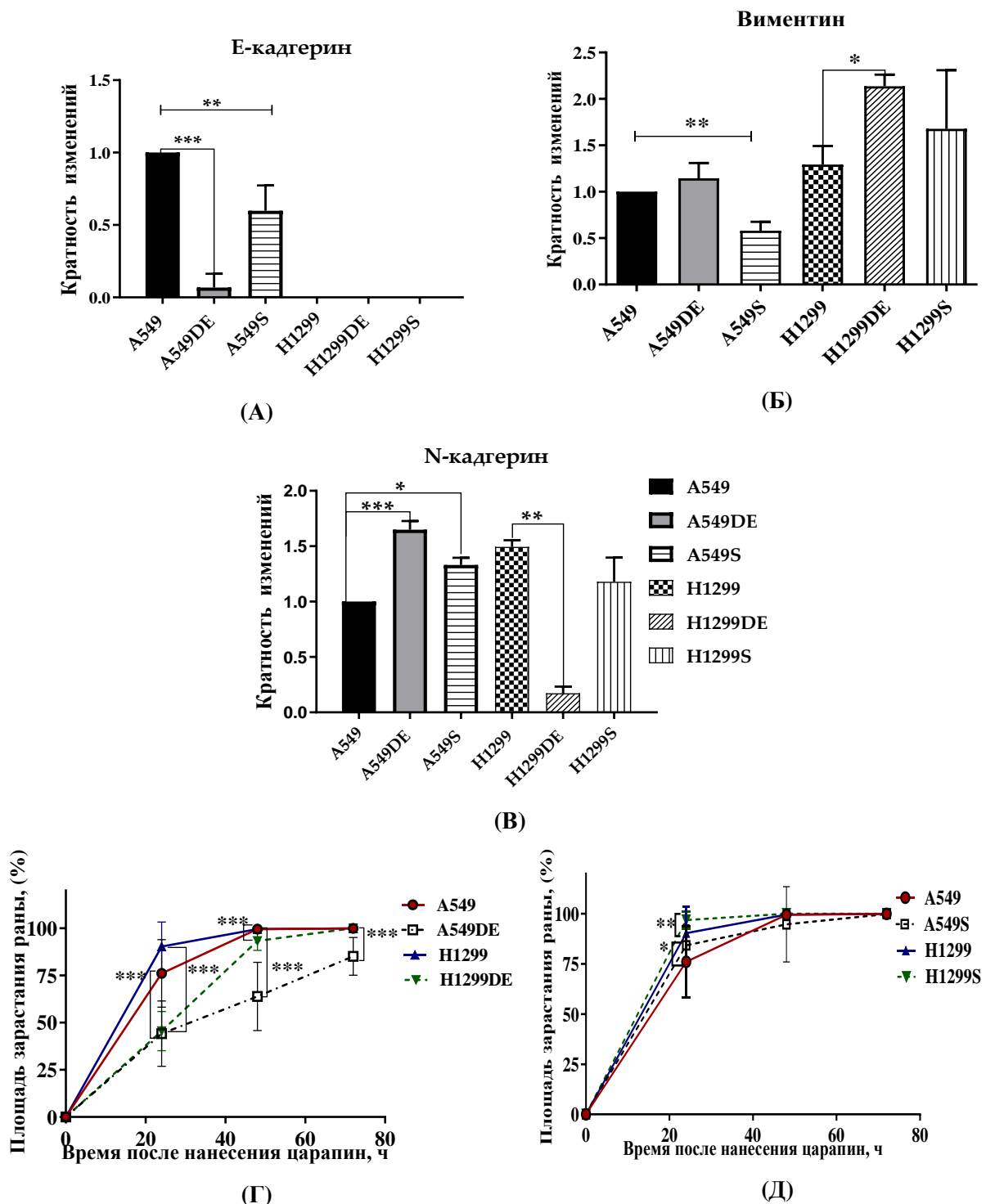


Рисунок 4. Количественный анализ экспрессии маркеров, связанных с ЭМП (А - В) и миграционная активность клеток через 24, 48 и 72 часа после нанесения царапин на монослое выживших клеток («scratch» тест) после режима FDE (Г) и режима SF (Д).

3.6 Экспрессия FRA1 в клетках НМРЛ в присутствии и отсутствии p53

Мы попытались ответить на вопрос о том, влияет ли режим фракционирования облучения на экспрессию FRA1 и коррелируют ли эти изменения с различиями в фенотипе, радиорезистентности, миграционном поведении и наличием p53 в выживших клетках НМРЛ. Мы показали, что экспрессия FRA1 в родительских клетках TP53null и выживших после облучения клетках (H1299DE и H1299S) была достоверно ($p < 0,01$, p

<0,001, $p < 0,05$, соответственно) выше, чем в родительских клетках *TP53*^{wt} и выживших клетках (A549DE и A549S) независимо от режима фракционирования дозы. С другой стороны, мы не обнаружили статистически значимых различий в экспрессии FRA1 между родительскими и выжившими после облучения популяциями клеток независимо от наличия *TP53* и режима облучения (данные представлены в диссертации).

3.7 Экспрессия транскрипционных факторов семейства *p53* в клетках ГБМ в ответ на облучение

Как и ожидалось, в отсутствии функционального *p53*, экспрессия *p63* и *p73* была повышена в родительских клетках *TP53*^{null} H1299 по сравнению с клетками *TP53*^{wt} A549 (Рис. 5). Облучение в режиме FDE приводило к статистически значимому снижению уровней *p63* и *p73* в клетках H1299DE в ~ 2 и 5 раза, соответственно. Тот же режим не изменил экспрессию этих белков в клетках A549DE. После облучения в режиме SF клетки A549S экспрессировали значительно больше *p63* (>2 раза) и меньше *p73*, тогда как экспрессия обоих белков была существенно подавлена в клетках H1299S по сравнению с родительскими клетками (Рис. 5 А, Б).

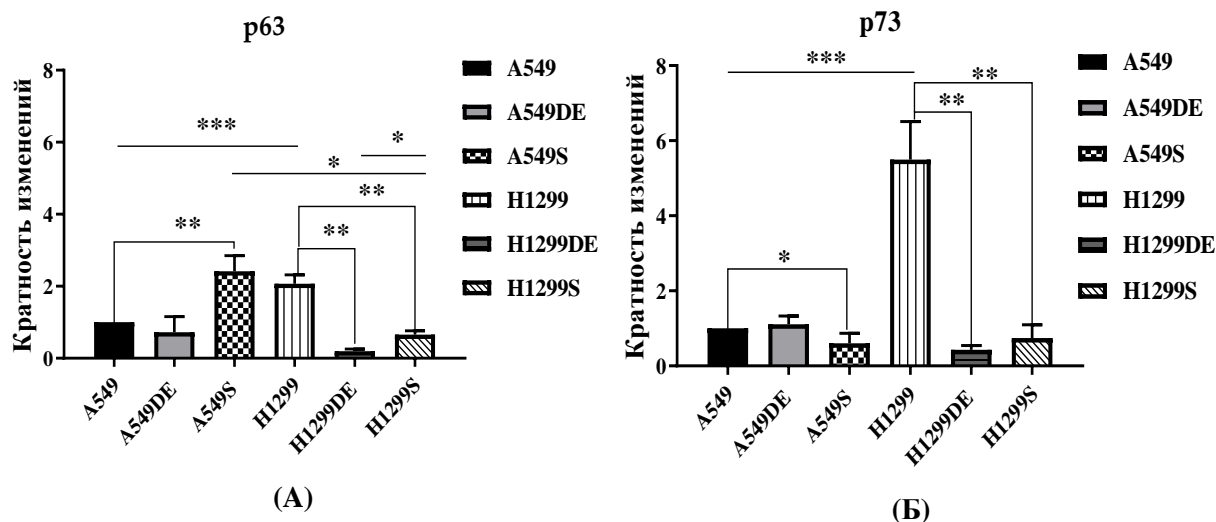


Рисунок 5. Количественный анализ экспрессии *p63* (А) и *p73* (Б) в родительских и выживших после фракционированного облучения клетках A549 и H1299.

3.8 Полиплоидия, индуцированная радиационным воздействием в клетках НМРЛ

Полиплоидные гигантские опухолевые клетки (ПГОК) являются еще одной отличительной чертой злокачественности опухолевой ткани, а полиплоидия связана с нестабильностью хромосом и прогрессированием рака. ПГОК в настоящее время широко признаны играющими значительную роль в опухолевом генезе, метастазировании, резистентности к терапии и рецидиве рака после терапии. Чтобы оценить возможную разницу в долях полиплоидных клеток между родительскими и выжившими после фракционированного облучения НМРЛ-клетками, мы провели анализ окрашивания йодида пропидия с использованием проточной цитометрии.

После облучения в режиме FDE доля ПГОК в популяциях выживших *TP53*^{wt} клеток снижается, а в популяциях выживших *TP53*^{null} клеток, напротив увеличивается (Рис. 6). Облучение в режиме SF вызывало увеличение доли ПГОК вне зависимости от наличия функционально-активного *TP53*. Наши результаты показали, что режим фракционирования влияет на образование ПГОК преимущественно в *TP53*^{wt} клетках, в

то время как в отсутствие транскрипционно-активного *TP53* увеличение доли ПГОК мало зависело от режима облучения.

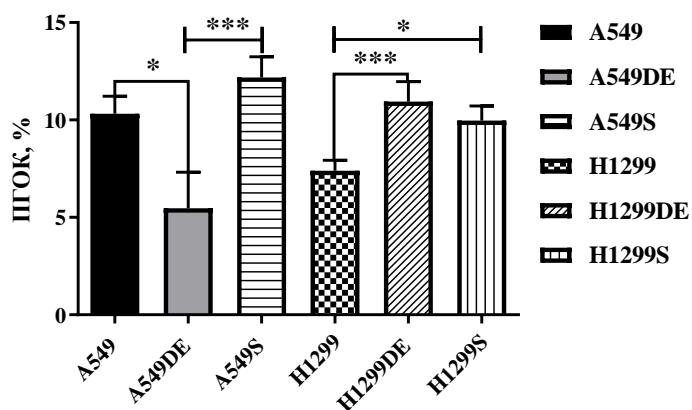


Рисунок 6. Доля ПГОК в родительских и выживших после фракционированного облучения клетках НМРЛ.

Обобщая, полученные нами данные позволили предположить, что значительное увеличение экспрессии p63 в опухолевых клетках, приобретение ими выраженного ЭМП фенотипа и состояния неглубокого репликативного и метаболического покоя, при значимом увеличении доли полиплоидных клеток, по-видимому, связано с повышенной клоногенной активностью и склонностью к репопуляции, лежащими в основе радиорезистентности клеточной линии *TP53wt* A549S. Интересно, что в отсутствие *TP53wt*, полное подавление экспрессии как p63, так и p73, повышенная экспрессия мезенхимального маркера виментина, сопровождающаяся значимым увеличением доли полиплоидных клеток, по-видимому, обеспечивает повышенную клоногенную активность и склонность к репопуляции, лежащим в основе повышенной радиорезистентности клеточных линий H1299DE и H1299S.

3.9 Изменение доли МГОК в трех клеточных линиях ГБМ в ответ на облучение

Было обнаружено, что изменение доли многоядерных гигантских опухолевых клеток (МГОК) в ответ на однократное облучение в терапевтически-релевантных дозах 2 - 6 Гр существенно различается для клеточных линий U87 (*TP53wt/PTENmut*), LN229 (*TP53mut/PTENwt*), U251 (*GOF TP53mut/PTENmut*) (Рис. 7). Клетки U87 и LN229, подвергшиеся однократному воздействию ИИ в использованных дозах, продемонстрировали наиболее значимое увеличение доли МГОК (LN229 -10, 6 и 24-кратное; U87 - 4, 3 и 2-кратное, при 2, 4 и 6 Гр, соответственно), тогда как доля тех же клеток для линии U251 существенно не отличались от своего контроля. Было также обнаружено, что некоторые МГОК линии U87, в отличие от таких же клеток линий LN229 и U251, могут генерировать многочисленные мононуклеарные клетки (называемые клетками Раджу или РЖ) и в конечном итоге образовывать клеточные колонии (процесс, называемый «неозисом») уже через 24 часа после облучения.

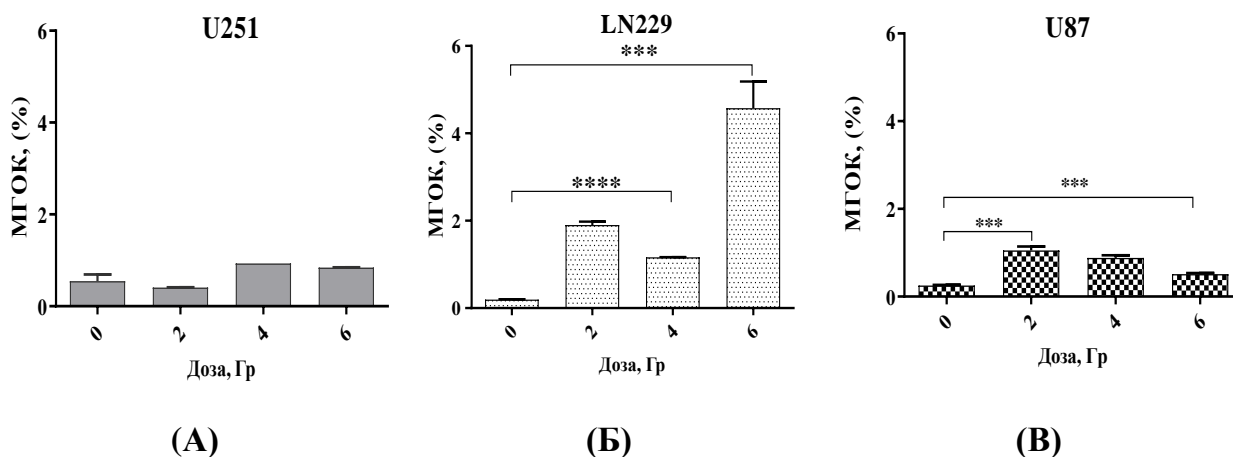


Рисунок 7. Доля МГОК в различных линиях ГБМ через 24 часа после облучения в дозах 2 - 6 Гр: (А) U251, (Б) U251 и (В) U87.

3.10 Изменение пролиферативной активности клеток различных линий ГБМ в ответ на облучение

В ответ на однократное облучение в дозе 6 Гр во всех исследованных клеточных линиях отмечалось статистически значимое снижение доли ДНК-реплицирующих клеток (Рис. 8). Однако облучение в дозе 2 Гр вызывало неоднозначный эффект: снижение пролиферативной активности в клетках линии U251 (*GOF TP53mut*) и увеличение пролиферативной активности клеток LN229 и U87, линий с генотипом *TP53* (Рис. 8).

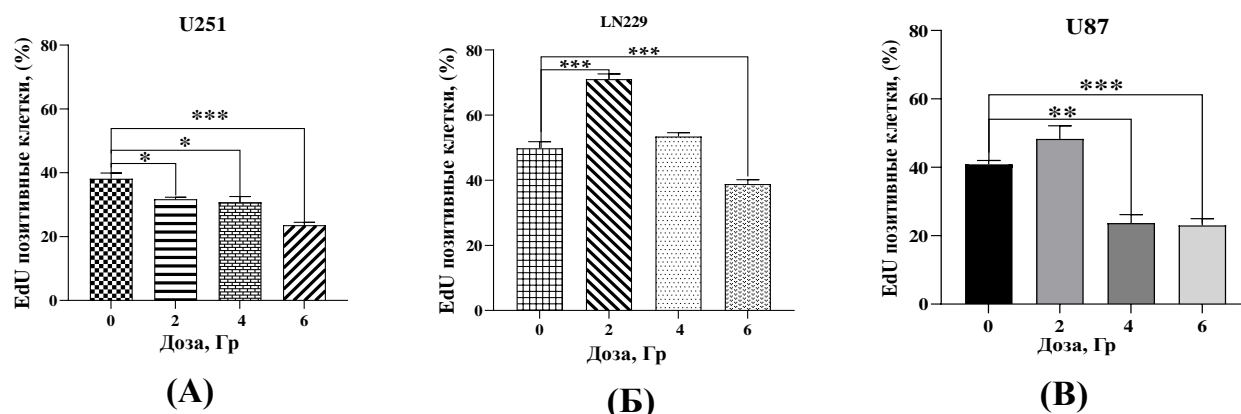


Рисунок 8. Изменения доли ДНК-реплицирующих клеток ГБМ (% EdU-позитивных клеток) через 24 часа после облучения: (А) U251, (Б) LN229, (В) U87.

При этом, ответ на облучение в дозе 6 Гр сопровождался увеличением популяции G0 клеток, находящихся в состоянии глубокого покоя (Ki67-/EdU-), во всех клеточных линиях независимо от мутаций *TP53/P TEN*. Результаты микроскопического анализа высокого разрешения индивидуальных клеток показали, что облучение приводит к образованию значимого количества ПГОК/МГОК, находящихся в состоянии G0 в клеточных линиях с *TP53* (либо wt (U87)), (либо *mut* (LN229)), но не в клетках с *GOF TP53mut*, где наблюдались только единичные такие клетки. Помимо этого, популяция G^{Alert}(Ki67+/EdU-) клеток, находящихся в состоянии неглубокого покоя, включая

ПГОК/МГОК, наблюдалась только в высокорезистентных клетках U87 с *TP53wt* (подробные данные приведены в тексте диссертации).

3.11 Изменение активности оксидоредуктаз и миграционной активности клеток различных линий ГБМ в ответ на облучение

Через 72 часа после облучения только в дозе 6 Гр метаболическая активность в клеточной линии с *GOF TP53mut* (U251) значительно снижалась по сравнению с необлученными клетками (Рис. 9 А, Б, В). В противоположность этому, обе клеточные линии LN229 и U87 с генотипом *TP53*, по сравнению с необлученными клетками, значительно уменьшали метаболическую активность независимо от дозы облучения.

Тем не менее, снижение активности оксидоредуктаз на 50% к 72 часам после облучения оказало влияние только на наиболее радиорезистентные клетки U87 как видно по их значительной временной задержке в ограниченной миграции 1-D (модель заживления ран или «scratch» тест) после воздействия радиации в дозах 2 и 4 Гр (Рис. 9 Е).

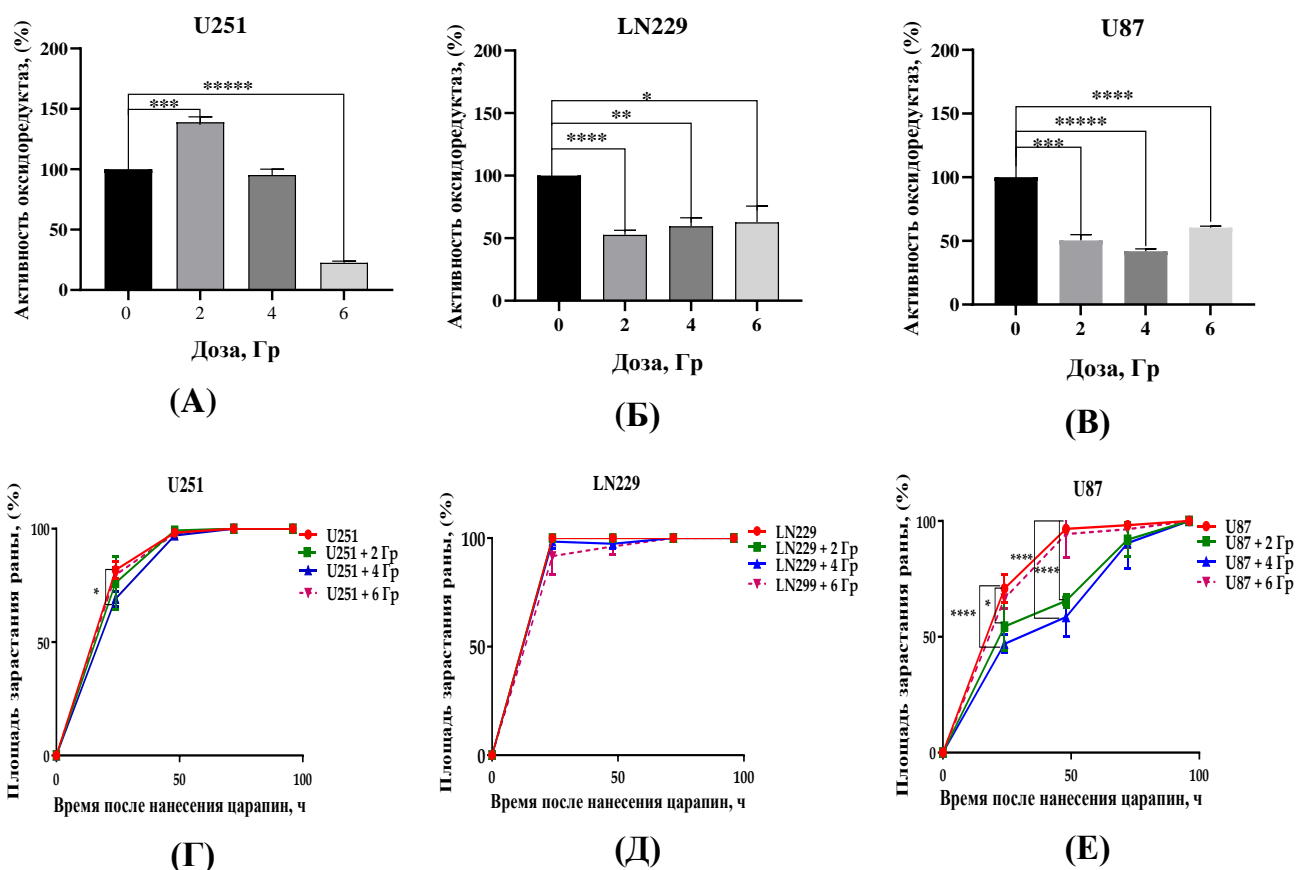
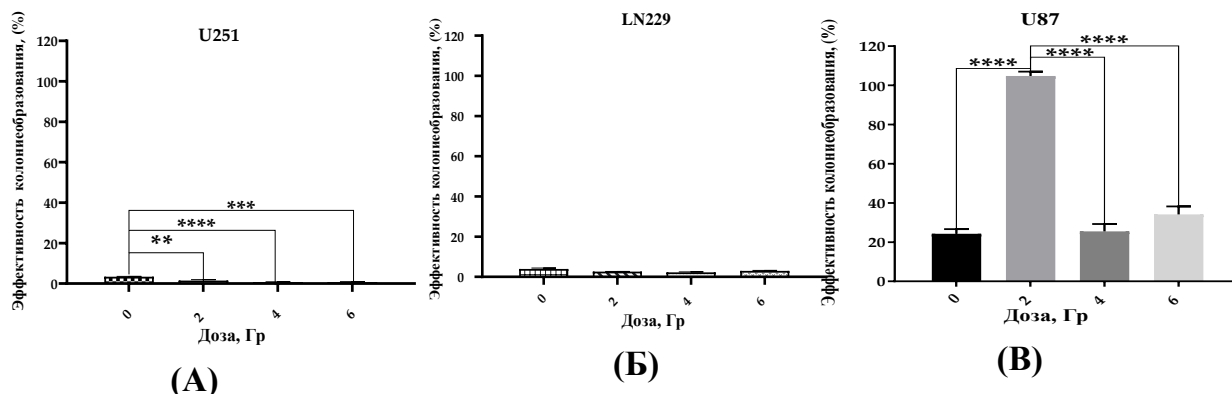


Рисунок 9. Результаты анализа активности оксидоредуктаз клеток (МТТ-тест) U251(А), LN229 (Б) и U87 (В) через 72 часа после облучения. Результаты анализа миграционной активности клеток U251(Г), LN229 (Д) и U87 (Е) через 24, 48, 72 и 96 часов после облучения.

3.12 Способность клеток ГБМ к репопуляции после облучения

Наблюдаемые РЖ клетки, полученные из U87 клеток, могут происходить в результате отпочкования от ПГОК/МГОК и/или асимметричного деления этих клеток. Было высказано предположение, что эти новые клетки, образованные в результате неоза, могут

быть ответственны за репопуляцию опухолевых клеток. Чтобы определить, индуцирует ли однократное рентгеновское излучение независимый от прикрепления рост клеток ГБМ, мы использовали анализ образования колоний в мягком агаре. Результаты представлены на Рис. 10 А-В.



Независимый от прикрепления рост

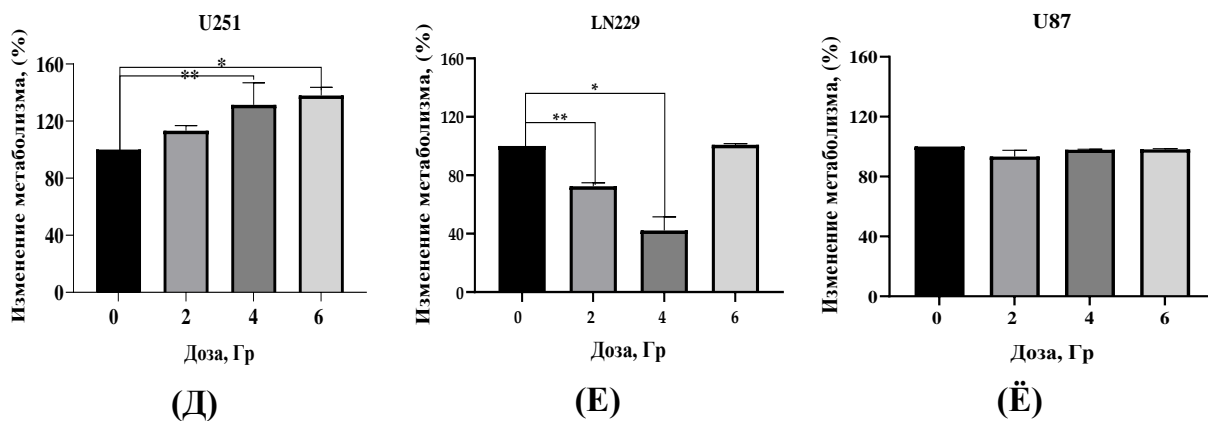
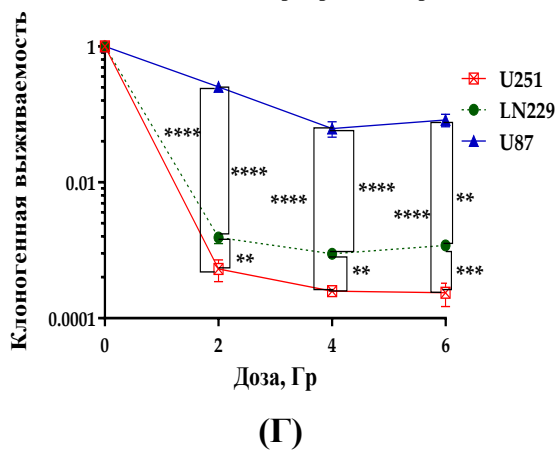


Рисунок 10. Эффективность колониеобразования (А-В) и клоногенная выживаемость (Г) при независимом от прикрепления росте клеток (А) U251, (Б) LN229 и (В) U87 в мягком агаре через 21 день после воздействия ИИ в дозах 2 - 6 Гр. Оценка метаболической активности клеток U251(Д), LN229 (Е) и U87 (Ё) через 7 дней после облучения с помощью AlamarBlue теста в мягком агаре.

Анализ образования колоний в мягком агаре показал почти 5-кратное увеличение эффективности колониеобразования после облучения клеток наиболее радиорезистентных клеток U87 в дозе 2 Гр (Рис. 10 В), снижаясь до контрольных значений после облучения в дозах 4 и 6 Гр. Подобный эффект не был обнаружен для клеток LN229 или U251: облучение в дозах 2 - 6 Гр либо не влияло (LN229), либо снижало

(U251) эффективность колониеобразования. Анализ клоногенной выживаемости клеточных линий ГБМ после облучения в дозах 2 - 6 Гр подтвердил значительно более высокую радиорезистентность клеток U87 по сравнению с клетками LN229 и U251 (Рис. 10 Г).

Примечательно, что клетки U251 образовывали более плотные колонии по сравнению с клетками LN229 и U87. Большинство колоний, полученных из U87, были диффузными с ореолом клеток, мигрирующих в агар, что указывает на наиболее высокую инвазивность клеток, составляющих колонию.

Формирование колоний не коррелировало с метаболической активностью (в тесте AlamarBlue) составляющих их клеток, которая либо не изменялась (U87), либо уменьшалась после облучения в дозах 2 и 4 Гр (LN229), либо увеличивалась после облучения в дозах 4 и 6 Гр (U251) через 7 дней после облучения (Рис. 10 Д, Е, Ё). Вместе, эти данные показали, что состояние метаболического покоя, по-видимому, связано с повышенной клоногенной выживаемостью и склонностью к репопуляции, лежащими в основе радиорезистентности *PTEN*-дефицитной клеточной линии *TP53wt* U87.

3.13 Влияние рентгеновского излучения на экспрессию *FRA1* в клетках ГБМ

Сверхэкспрессия *FRA1* (кодируемого геном *FOSL1*), белка лейцинового zipper, образующего комплекс факторов транскрипции AP-1, может способствовать диссеминации опухоли благодаря его возможной роли в ЭМП-подобном процессе и метастатическом распространении, управляя экспрессией ЭМП-индуцирующих факторов транскрипции, цитокинов и микроРНК. Поэтому, мы проанализировали уровни экспрессии *FRA1* после воздействия различных доз рентгеновского излучения.

Интересно, что облучение как U87, так и U251 клеток, лишь незначительно снижало экспрессию *FRA1* (*FOSL1*), фактор транскрипции, который принимает участие в контроле архитектуры и миграционной активности клеток ГБМ. Хотя общая экспрессия *FRA1* в клетках LN229, была значительно (>3 раза) выше, чем в клетках U87 и U251, ни одна из доз рентгеновского излучения не оказала существенного влияния на экспрессию *FRA1* в клетках LN229 (данные представлены в тексте диссертации). Поэтому мы предположили, что воздействие ИИ существенно не влияет на экспрессию *FRA1* в облученных клетках ГБМ независимо от мутаций в *TP53/PTEN*.

3.14 Экспрессия белков семейства *p53* в клетках ГБМ в ответ на облучение

Доминантно-негативные мутации (Gain-of-Function) в белке *p53* (*GOF TP53mut*) недостаточно изучены в ГБМ. *p73* и *p63*, члены семейства *p53*-белков, структурно и функционально гомологичны *p53*, и было показано, что они восстанавливают опухоле-супрессивные функции *p53* в отсутствие *TP53mut*. Однако, как и *TP53wt*, эта активность ингибируется белок-белковыми взаимодействиями между *p53mut* и *p63/p73*. Кроме того, ингибирование белков *p63* и *p73* способствует инвазии опухолевых клеток. Ген *PTEN* индуцируется *TP53* и, учитывая, что $\Delta Np63\alpha$ может блокировать функции *p53* и связываться с *p53*-чувствительными элементами (REs), вполне вероятно, что $\Delta Np63\alpha$ может отрицательно регулировать *PTEN*.

Нами впервые продемонстрировано, что облучение терапевтическими дозами ИИ изменяет экспрессию транскрипционных факторов *p63* и *p73* соответственно мутациям *TP53/PTEN* в клетках ГБМ. В частности, наблюдалось повышение экспрессии белка *p63* как в клетках U87, так и U251, содержащих *PTENmut*, по сравнению с их сингенными необлученными клетками (Рис. 11 А).

Следует отметить, что в клетках U87, содержащих *TP53wt*, увеличение p63 было выше (3,4 - 2,5 раза в зависимости от дозы) по сравнению с клетками U251, несущими *GOF TP53mut*, где увеличение составило только 1,2 - 1,4 раза. Напротив, облучение клеток LN229, несущих *PTENwt* и *TP53mut*, значительно увеличило (>10 и > 2 раз) экспрессию белка p73 после облучения в дозе 2 и 4 Гр, соответственно (Рис. 11Б). Эти данные позволяют предположить, что: 1) мутации *PTEN* в клетках ГБМ могут влиять на ИИ-стресс-индуцированную экспрессию p63/p73; 2) увеличение экспрессии p63 в отсутствие *PTENwt* может быть связано с повышенной склонностью *TP53wt* клеток к репопуляции (Рис.10), тогда как подъем экспрессии p73 при наличии *PTENwt* снижает эту склонность, несмотря на изначально повышенное образование МГОК клетками LN229 (Рис.7). Нами было предположено, что дальнейшая судьба (выбор между апоптозом или спасительным преждевременным старением) подвергшихся облучению опухолевых клеток, включая предсуществующие и вновь образованные МГОК, может определяться мутациям *PTEN* в клетках ГБМ.

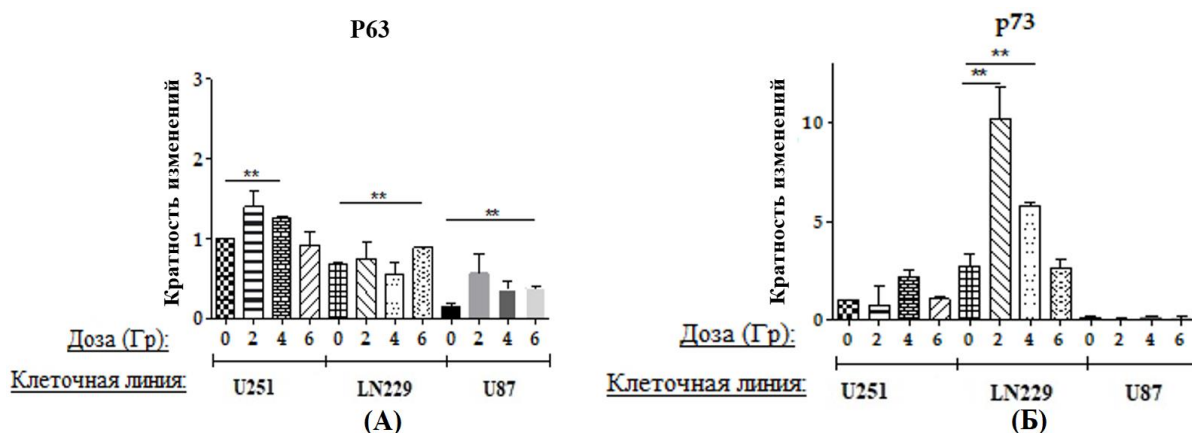


Рисунок 11. Количественный анализ экспрессии p63 (А) и p73 (Б) в облученных клетках ГБМ в дозах 2 - 6 Гр.

3.15 Молекулярные маркеры ЭМП в клетках ГБМ в ответ на облучение

Обнаружение того, что экспрессия p63/p73 значительно повышена в клетках ГБМ, вызвало наш интерес к ассоциации их экспрессии с развитием признаков ЭМП, способствующих миграции клеток ГБМ после воздействия ИИ. Мы оценили паттерны экспрессии белка Е-кадгерина, N-кадгерина и Виментина в качестве классических маркеров ЭМП в ГБМ человека, используя анализ с помощью вестерн-блоттинга.

Образование МГОК в клеточных популяциях ГБМ сопровождалось изменениями экспрессии Е- и N-кадгеринов и Виментина в ответ на различные дозы облучения (Рис. 12 Б, В, Г). В *PTEN*-дефицитных клеточных линиях облучение индуцировало смешанный фенотип ЭМП. В частности, только в наиболее радиорезистентных клетках U87 с *TP53wt/PTENmut* после облучения в дозе 6 Гр был обнаружен фенотип, характерный для ЭМП – значительное снижение экспрессии эпителиального маркера Е-кадгерина и значительное увеличение мезенхимальных маркеров Виментина и N-кадгерина. Однако облучение тех же клеток в дозе 4 Гр увеличивало значительно экспрессию Е-кадгерина и Виментина, и лишь незначительно N-кадгерина.

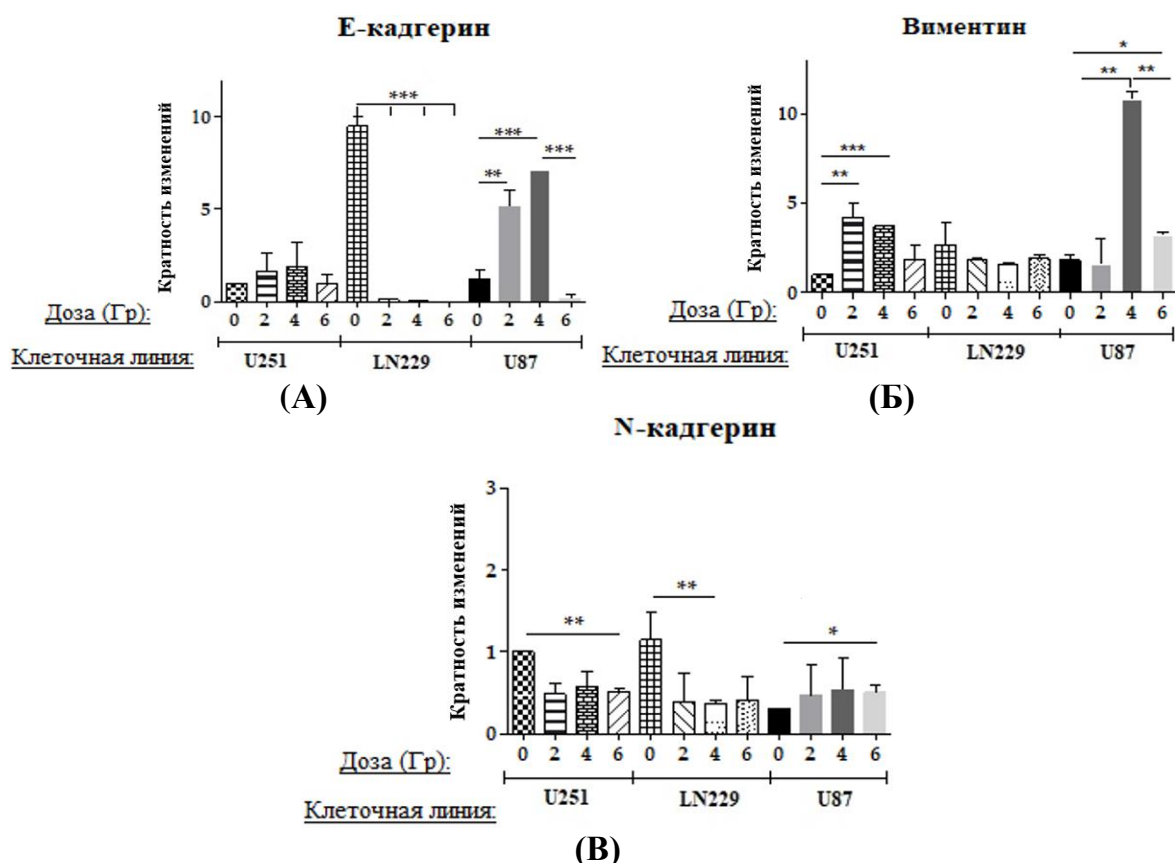


Рисунок 12. Анализ экспрессии эпителиальных (Е-кадгерина) (А) и мезенхимальных (Виментина) (Б) и (N-кадгерина) (В) маркеров, связанных с ЭМП в клетках ГБМ, облученных в дозах 2 - 6 Гр, относительно необлученных клеток U251.

Облученные GOF *TP53mut/PTENmut* U251 клетки экспрессировали значительно больше Виментина при значительном снижении экспрессии N-кадгерина. В присутствии *PTENwt* облученные клетки с *TP53mut* (LN229) экспрессировали наименьшее количество всех 3 маркеров ЭМП, при чем любая из выбранных доз ИИ значительно снижала экспрессию обоих кадгеринов (более чем в 63 и 3 раза для Е- и N-кадгерина, соответственно) без статистически значимого влияния на экспрессию Виментина в клетках с *TP53mut* (LN229) (Рис. 12 А, Б и В).

Таким образом, отсутствие *PTEN* в *TP53wt* клетках ГБМ (U87) видимо коррелировало с дозозависимой модуляцией экспрессии маркеров ЭМП: высокая доза (6 Гр) повышала выраженность ЭМП фенотипа, тогда как более низкие дозы (2 - 4 Гр) вызывали смешанный фенотип (повышение эпителиальных (Е-кадгерин), так и мезенхимальных маркеров (Виментин) в ответ на однократное воздействие ИИ. Это позволило предположить, что приобретение такого смешанного (гибридного) фенотипа возможно давало этим клеткам преимущества в клоногенной выживаемости после облучения в дозах 2 - 4 Гр.

3.16 Оценка клеточного старения в клетках ГБМ после облучения

Повышенный уровень ассоциированной со старением активности фермента бета-галактозидазы (SA- β -Gal) является важным маркером высокой лизосомальной активности и содержания лизосом во время реакции на стресс. Известно, что p53 играет решающую роль в клеточном старении. Поэтому мы проанализировали активность SA- β -Gal в ответ на облучение клеток ГБМ через 48 часов после ИИ-индуцированного стресса.

Анализ SA-β-Gal показал, что облучение основной популяции клеток U87 в дозах 4 - 6 Гр статистически значимо увеличивало долю SA-β-Gal+ с 10 до 35 - 50% (Рис. 13 Б), тогда как доля тех же клеток в линиях U251 и LN229 не изменялась (Рис. 13 А и В).

Важно отметить, что в отсутствие *PTEN* облучение в дозе 2 Гр вызывало статистически значимое 2-кратное увеличение доли SA-β-Gal+ МГОК только в *TP53wt* линии U87, демонстрируя лишь тренд к увеличению той же фракции в *GOF TP53mut* клетках U251. При этом при наличии *PTENwt* только облучение в дозе 4 Гр лишь незначительно увеличивало фракцию SA-β-Gal+ МГОК в *TP53mut* LN229 клетках.

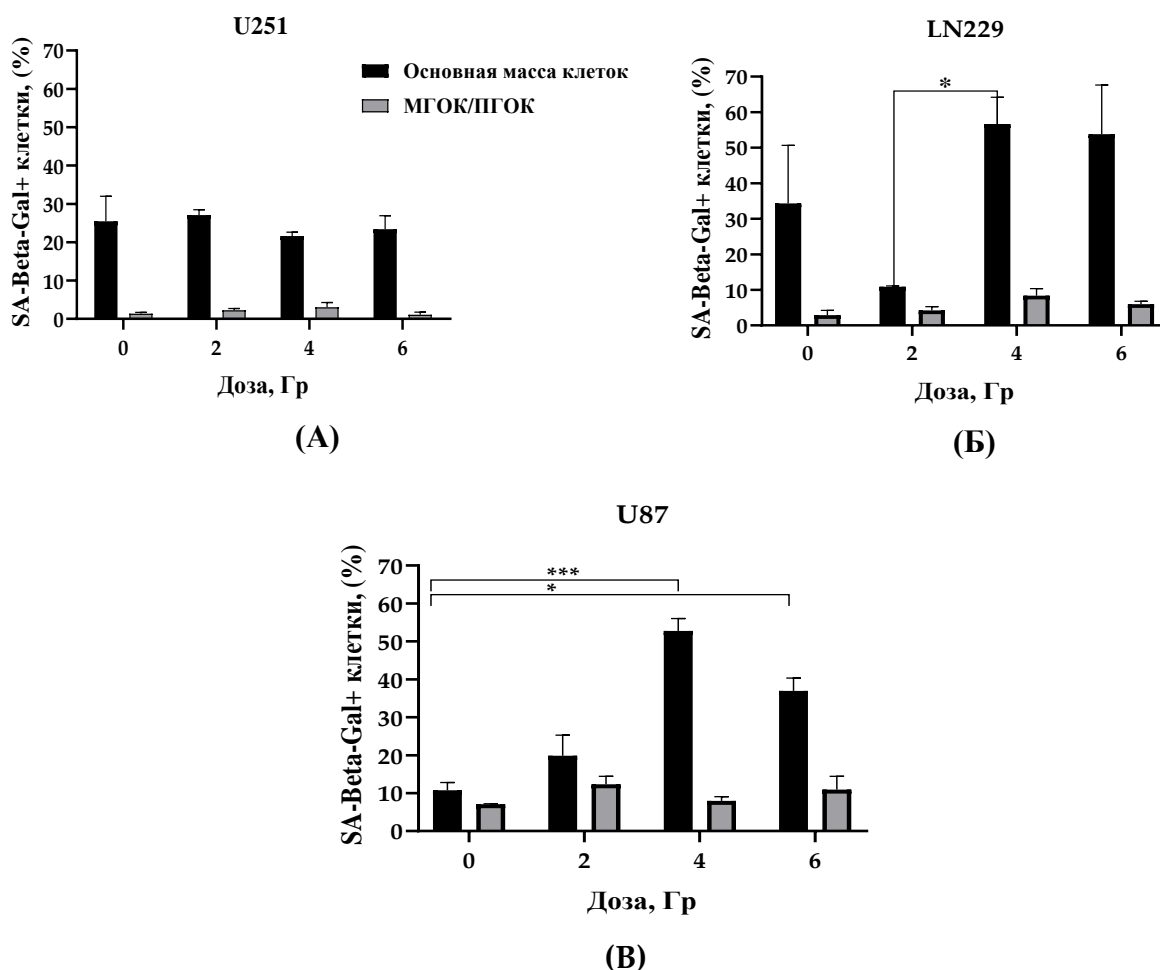


Рисунок 13. Изменение доли SA-β-Gal позитивных клеток (%) в контрольных и облученных клетках U251(А), LN229 (Б) и U87 (В) через 24 часа после воздействия.

Таким образом, полученные нами данные позволили предположить, что значительное увеличение экспрессии p63 в опухолевых клетках, приобретение ими смешанного ЭМП фенотипа, появление популяции $G^{Alert}(Ki67+/EdU-)$ клеток, находящихся в состоянии неглубокого репликативного и метаболического покоя, при значительном увеличении доли многоядерных клеток с признаками преждевременного старения, по-видимому, связано с повышенной клоногенной выживаемостью и склонностью к репопуляции, лежащими в основе радиорезистентности *PTEN*-дефицитной клеточной линии *TAp53wt* U87. В целом, полученные данные свидетельствуют о прямой корреляции между радиорезистентностью клеток ГБМ и степенью стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS) (SA-β-Gal+ / Ki67^{low}), которое, вероятно, более значительно стимулируется именно в *TP53wt*, а не в *GOF TP53mut* клетках ГБМ.

ВЫВОДЫ

1. Потомство клеток НМРЛ, выживших после фракционированного облучения в режиме FDE, независимо от наличия *TP53*, обладало повышенной радиорезистентностью и сохранением репродуктивной активности, в то время как после облучения в режиме SF аналогичные эффекты наблюдались только в *TP53null* клетках.

2. Потомство *TP53*-дефицитных клеток линии H1299 НМРЛ, выживших после фракционированного облучения, обладало наиболее высокой способностью к независимому от адгезии росту - характерной черте злокачественности опухолевых клеток, обеспечивающей повышенную клоногенную выживаемость и склонность к метастазированию опухолевых клеток после радиотерапии.

3. Радиорезистентность, связанная с активацией гибридного ЭМП-подобного процесса, обеспечивается: снижением экспрессии *p73* безотносительно наличия *p53*, лежащим в основе увеличения доли ПГОК/МГОК, эффективностью независимого от прикрепления роста и снижением метаболизма как у выживших после фракционированного облучения клеток линий НМРЛ, так и у облученных однократными дозами клеток линий ГБМ.

4. Наличие генотипа *TP53wt/PTENmut* ассоциировано с увеличением количества сенесцентных МГОК в ответ на терапевтические дозы облучения и поддержания репродуктивно-активных радиорезистентных клеток линии U87 ГБМ.

5. Различия в пролиферации, колониеобразовании и радиационной толерантности клеток линий ГБМ связаны с их способностью к образованию преждевременно стареющих гигантских многоядерных клеток и неозису, а не с экспрессией мутантного *p53*.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах.

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus:

1. Lina Alhaddad, Margarita Pustovalova, Taisia Blokhina, Roman Chuprov-Netochin, Andreyan N. Osipov, and Sergey Leonov. IR-Surviving NSCLC Cells Exhibit Different Patterns of Molecular and Cellular Reactions Relating to the Multifraction Irradiation Regimen and p53-Family Proteins Expression. // *Cancers*. 2021. V. 13. № 11. e2669 (P. 1-20). <https://doi.org/10.3390/cancers13112669> (WOS, Q1, IF=6.575), 85%.
2. Margarita Pustovalova, Lina Alhaddad, Nadezhda Smetanina, Anna Chigasova, Taisia Blokhina, Roman Chuprov-Netochin, Petr Eremin, Ilmira. Gilmutdinova, Andreyan N. Osipov, and Sergey Leonov. The CD44^{high} Subpopulation of Multifraction Irradiation-Surviving NSCLC Cells Exhibits Partial EMT-Program Activation and DNA Damage Response Depending on Their p53 Status. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. № 5. e2369 (P. 1-24). <http://doi.org/10.3390/ijms22052369> (WoS, Scopus, Q1, IF=6.208), 65%.
3. Margarita Pustovalova, Lina Alhaddad, Nadezhda Smetanina, Anna Chigasova, Taisia Blokhina, Roman Chuprov-Netochin, Andreyan N. Osipov, and Sergey Leonov. The p53–53BP1-Related Survival of A549 and H1299 Human Lung Cancer Cells after Multifractionated Radiotherapy Demonstrated Different Response to Additional Acute X-ray Exposure // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. № 9. e3342 (P. 1-21). <http://doi.org/10.3390/ijms21093342> (WoS, Scopus, Q1, IF=6.208), 70%.
4. Margarita Pustovalova, Taisia Blokhina, Lina Alhaddad, Anna Chigasova, Roman Chuprov-Netochin, Alexander Veviorskiy, Gleb Filkov, Andreyan N. Osipov and Sergey Leonov.

- CD44+ and CD133+ Non-Small Cell Lung Cancer Cells Exhibit DNA Damage Response Pathways and Dormant Polyploid Giant Cancer Cell Enrichment Relating to Their p53 Status. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. e4922 (P. 1-26). <https://doi.org/10.3390/ijms23094922> (WoS, Scopus, Q1, IF=6.208), 55%.
5. М.В. Пустовалова, Е.И. Гусарова, Л. Алхаддад, А.Н. Осипов, Y. Chen, С.В. Леонов. Фенотипические характеристики дорmantных клеток немелкоклеточного рака лёгкого человека, выживших после мультифракционного рентгеновского облучения. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022, Т. 174, № 7. С. 89-93. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-7-89-93> (РИНЦ, Q3, IF= 0,741), 30%.
6. Пустовалова М.В., Гурьянова А.А., Сорокин М.И., Сунцова М.В., Буздин А.А., Алхаддад Л., Осипов А.Н., Леонов С.В. Транскриптомный анализ путей репарации ДНК в клетках немелкоклеточного рака лёгкого человека, выживших после мультифракционного рентгеновского облучения. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. Т. 173. № 4. С. 462-467. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-4-462-467> [Pustovalova M.V., Guryanova A.A., Sorokin M.I., Suntsova M.V., Buzdin A.A., Alhaddad L., Osipov A.N., Leonov S.V. Transcriptomic Analysis of DNA Repair Pathways in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Surviving Multifraction X-Ray Irradiation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2022. V. 173(4). P. 454-458. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05586-0>] (RSCI, WoS, Scopus, Q3, IF= 0,741), 30%.