

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»

На правах рукописи



Алхаддад Лина

**Клеточно-молекулярные механизмы радиорезистентности
немелкоклеточного рака легких и мультиформной
глиобластомы человека**

Специальность 1.5.1 – Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., профессор РАН **Осипов Андреян Николаевич**

к.б.н. **Леонов Сергей Викторович**

Москва -2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Лучевая терапия немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) человека	16
1.2 Лучевая терапия мультиформной глиобластомы (ГБМ) человека	17
1.3 Гетерогенность и пластичность опухолевых клеток	20
1.4 Опухолевые стволовые клетки (ОСК) и их возможная роль в возникновении и прогрессировании опухолей	22
1.5 Перекрестные взаимодействия между ОСК и их нишами	26
1.6 Процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП)	30
1.7 Основные механизмы репарации двуниевых разрывов ДНК и их роль в судьбе клетки	32
1.8 Радиационно-индуцированное преждевременное старение (сенесценция) опухолевых клеток	36
1.9 Роль полиплоидных/многоядерных гигантских опухолевых клеток (ПГОК/МГОК) в метастазировании и рецидиве после противоопухолевого лечения	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1 Культивирование клеточных линий НМРЛ	57
2.2 Культивирование клеточных линий ГБМ.....	57
2.3 Облучение	57
2.4 Сортировка клеток.....	59
2.5 Анализ клеточной полиплоидии.....	59
2.6 Клоногенный тест	61
2.7 Анализ независимого от адгезии к пластику роста клеток в мягком агаре	61

2.8 Анализ пролиферации клеток с помощью EdU	62
2.9 Иммунофлуоресцентное окрашивание Ki67 и N-кадгерина	63
2.10 Активность оксидоредуктаз (МТТ тест) клеток.....	64
2.11 Анализ миграционной активности клеток с помощью теста на заживление «раны» (wound healing model или «скретч-тест»)	65
2.12 Вестерн-блоттинг	65
2.13 Анализ экспрессии фактора транскрипции FRA1	67
2.14 Анализ доли МГОК в клеточных популяциях	67
2.15 Анализ метаболизма клеток в составе колоний - AlamarBlue-тест в мягком агаре	68
2.16 Анализ ассоциированной со старением бетта-галактозидазы (β -Gal)	69
2.17 Статистический анализ	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	71
3.1 Фенотип и радиочувствительность клеток НМРЛ, выживших после фракционированного облучения с различными режимами	71
3.2 Влияние режима фракционирования на способность клеток НМРЛ к репопуляции после облучения	73
3.3 Изменение пролиферативной активности и активности оксидоредуктаз в клетках НМРЛ в ответ на облучение	76
3.4 Пролиферативная активность в изолированных популяциях клеток НМРЛ, имеющих ОСК-маркеры.....	77
3.5 Влияние режимов фракционированного облучения на активацию программы ЭМП и 1D миграцию выживших клеток НМРЛ	81
3.6 Экспрессия FRA1 в клетках НМРЛ в присутствии и отсутствии p53.....	84
3.7 Экспрессия транскрипционных факторов семейства p53 в клетках ГБМ в ответ на облучение.....	85

3.8 Полиплоидия, индуцированная радиационным воздействием в клетках НМРЛ	87
3.9 Изменение доли МГОК в трех клеточных линиях ГБМ в ответ на облучение	89
3.10 Изменение пролиферативной активности клеток ГБМ различных линий в ответ на облучение.....	90
3.11 Изменение активности оксидоредуктаз и миграционной способности клеток ГБМ в ответ на облучение.....	95
3.12 Способность клеток ГБМ к репопуляции после облучения	97
3.13 Влияние рентгеновского излучения на экспрессию FRA1 в клетках ГБМ	100
3.14 Экспрессия белков семейства p53 в клетках ГБМ в ответ на облучение	102
3.15 Молекулярные сигнатуры ЭМП в клетках ГБМ в ответ на облучение	104
3.16 Оценка клеточного старения в клетках ГБМ после облучения	107
ОБСУЖДЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ	131
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	135
БЛАГОДАРНОСТИ.....	182

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) составляет 85% случаев рака легких [1], из них около 40% случаев являются неоперабельными [2], а 5-летняя общая выживаемость составляет всего около 15% [1]. Глиобластома (ГБМ) является наиболее распространенной первичной опухолью центральной нервной системы у взрослых, на которую приходится около 50% всех глиом и 15% первичных опухолей головного мозга [3]. Прогноз у пациентов с ГБМ неблагоприятный в онкологии, а средняя общая продолжительность жизни составляет около 15 - 17 месяцев [4]. Лучевая терапия (ЛТ) является одним из основных методов лечения пациентов с НМРЛ [5] и ГБМ [6]. Однако, устойчивость НМРЛ и ГБМ к воздействию ионизирующего излучения (ИИ) остается существенным фактором, ограничивающим успешный терапевтический результат [7, 8].

Полагают, что одной из основных причин терапевтических неудач является присутствие в гетерогенной опухоли особых клеток, называемых опухолевыми стволовыми клетками (ОСК) из-за схожих молекулярно-клеточных характеристик с нормальными стволовыми клетками человека [9]. Они обладают способностью к бесконечному самообновлению [10, 11], гипоксическим типом метаболизма, высокой эффективностью процессов репарации ДНК [10, 12] и подвергаться 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 переживать неблагоприятные условия. 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 [13], а появление ПГОК/МГОК в составе опухоли ассоциировано с высокой агрессивностью заболевания и плохим прогнозом [14]. 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 [15].

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 проблема 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 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 *TAp53/PTEN* этих клеток. Продемонстрировано, что формирование сенесцентных ПГОК/МГОК может быть путем выживания клеток НМРЛ и ГБМ после ЛТ. Впервые показано, что режим фракционирования влияет на образование ПГОК преимущественно в клетках *TAp53wt* НМРЛ, в то время как в отсутствие гена *TAp53* 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 клеточных 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 возможную 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 клеточно-молекулярных механизмов и динамики формирования и функционирования ПГОК/МГОК, 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 адъювантной 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; рентгеновская установка для облучения культур клеток; метод проточной цитометрии для анализа клеточной полиплоидии и уровня экспрессии FRA1; анализ роста колоний в мягком агаре «Soft Agar Colony Formation Assay» для оценки способности клеток к репопуляции после облучения; метод включения EdU для оценки пролиферации клеток в S-фазе клеточного цикла; метод МТТ для оценки активности оксидоредуктаз в клетках; «scratch-тест» для изучения миграционных свойств 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 ГБМ; анализ активности β - галактозидазы для

оценки количества стресс-индуцированных преждевременно сенесцентных (SIPS) 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 научно-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.

Участие в конкурсах по теме диссертации

1. V Всероссийский молодежный научный конкурс «Наука будущего - наука молодых», 30.11.2020 по 03.12.2020, Москва;
2. Конкурс «Лучший доклад секций» в рамках 64-ой Всероссийской научной конференции МФТИ. 29.11.2021 по 03.12. 2021, Москва.

Список опубликованных по теме диссертации печатных работ. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в международных рецензируемых журналах первого квартиля (Q1) Web of Science и 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 дормантных 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), 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%.
7. XVI Курчатовская междисциплинарная молодёжная, научная школа НИЦ «Курчатовский Институт». 2019, Москва. Тезисы. Особенности формирования радиобиологических эффектов в радиорезистентной популяции клеток линии А549». Соавторы: М.В. Пустовалова, Н.М. Сметанина, А.К. Грехова, С.В. Леонов, А.Н. Осипов.
 8. XXV ежегодная научная конференция ФИЦ ХФ РАН. 3 марта 2020 г., Москва. Тезисы. «Особенности радиобиологических эффектов в клетках линии Н1299, выживших после фракционированного воздействия рентгеновского излучения». Соавторы: М.В. Пустовалова, Н.М. Сметанина, А.К. Грехова, С.В. Леонов, А.Н. Осипов.
 9. V Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего - наука молодых». 30.11.2020 по 03.12.2020, Московский Авиационный Институт (МАИ), Москва. Тезисы. Способность клеток немелкоклеточного рака легких человека выживать после мультифракционированной лучевой терапии связана с p53/53bp1 сигнальными путями. Алхаддад Лина.
 10. VIII Съезд по радиационным исследованиям по радиационным исследованиям. Тезисы. Особенности радиобиологических эффектов в клетках рака легкого человека линий А549 И Н1299, выживших после мультифракционированного рентгеновского облучения. 12 - 15 октября, 2021 г., Москва. Л. Алхаддад, М.В. Пустовалова, Н.М. Сметанина, А.К. Грехова, Т.М. Блохина, Р.Н. Чупров-Неточин, А.Н. Осипов, С.В. Леонов.

- 11.VIII Съезд по радиационным исследованиям по радиационным исследованиям. 12 - 15 октября, 2021 г., Москва. Тезисы. P53 обусловленные эффекты в клетках немелкоклеточного рака легкого человека и их радиорезистентных сублиний. Соавторы: М.В. Пустовалова, Н.М. Сметанина, А.К. Грехова, А.Н. Осипов, С.В. Леонов.
- 12.Ninth International Conference on Radiation in Various Fields of Research. Тезисы. (4th - 18th June, Herceg Novi. Montenegro, 2021), Irradiation-surviving NSCLC cells exhibit partial EMT-program activation and altered DNA damage response depending on their p53 Status. Co-authors: Margarita Pustovalova, Taisia Blokhina, Andreyan Osipov and Sergey Leonov. <http://doi.org/10.21175/rad.abstr.book.2021.8.10>.
- 13.64-я Всероссийская научная конференция. 2021 г., МФТИ, Москва. Тезисы. Обогащение клеточных линий глиобластомы, различающихся по радиорезистентности и статусу TP53/PTEN, полиплоидными/многоядерными гигантскими клетками в ответ на ионизирующее излучение. Л. Алхаддад, М.В. Пустовалова, А.Н. Осипов и С.В. Леонов.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключался в непосредственном участии в проведении всех экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных.

Объем и структура 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лучевая терапия немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) человека

НМРЛ является наиболее часто диагностируемым раком легкого [16], составляя почти 90% всех случаев рака легких. НМРЛ включает 3 основных гистологических типа: аденокарциному (30 - 45%), плоскоклеточный (25 - 40%) и крупноклеточный (5%) рак. У более половины пациентов с НМРЛ в основном диагностируется стадия III развития заболевания (опухоль до 6 см, находящаяся в границах сегмента легкого или бронха с единичными метастазами в отдельных лимфоузлах, ограниченных грудной клеткой на стороне поражения) и стадия IV (когда опухоль метастазирует в другие органы). Прогноз для больных НМРЛ часто является неблагоприятным, при общей 5-летней выживаемости от 2 до 15% [17]. ЛТ используется для лечения НМРЛ в качестве основного метода лечения местнораспространенных неоперабельных опухолей или назначается одновременно с химиотерапией. Целенаправленная ЛТ в основном показана для пациентов, у которых диагностирована I-III стадия развития НМРЛ [18]. Согласно современным оценкам, доля пациентов с НМРЛ, которым показана ЛТ, колеблется от 46% до 68% для впервые диагностированных пациентов и от 64% до 75% для всей когорты пациентов с НМРЛ. Фактическое использование ЛТ во всем мире ниже - в диапазоне от 28% до 53%, с наиболее существенными различиями между фактическим и предполагаемым использованием ЛТ для пациентов с III стадией НМРЛ [19]. Тем не менее, радиорезистентность опухолевых клеток и риск рецидива заболевания являются основными препятствиями для долгосрочного благоприятного прогноза выживаемости пациентов, перенесших ЛТ [19].

Стандартным подходом к лечению локально диссеминированной формы НМРЛ является традиционная мультифракционная лучевая терапия (МФЛТ) (2D) в дозе за фракцию 1,8 - 2,0 Гр/день в течение пяти дней в неделю до достижения суммарной дозы ~ 60 - 66 Гр (стандарт, установленный группой радиационной онкотерапии RTOG7301) в сочетании с одновременной химиотерапией препаратами на основе платины [20-22].

ЛТ вызывает гибель относительно радиочувствительных популяций опухолевых клеток, оставляя ОСК живыми, способствуя тем самым адаптационной радиорезистентности путем избирательной репопуляции опухолевых клеток из выживших ОСК [23].

Облучение опухолевых клеток в режимах МФЛТ может привести к селективному отбору субпопуляций опухолевых клеток с измененными характеристиками в ответ на последующее облучение и повлиять на возможность контроля развития опухоли [24]. Подобный процесс селективного отбора широко используется в качестве экспериментального инструмента для получения радиорезистентных субпопуляций опухолевых клеток. Получение таких радиорезистентных клеток позволяет исследовать их реакции на молекулярном уровне и подсказать правильное направление улучшения стандартной ЛТ [25].

Стереотаксическая лучевая терапия (СЛТ) (3D) является потенциально более эффективной технологией для купирования ранней стадии НМРЛ у неоперабельных пациентов и часто используется для пациентов с рецидивом заболевания после проведенной ранее обычной радиотерапии [26]. СЛТ позволяет врачам проводить облучение в высоких дозах за фракцию (обычно используемые режимы составляют 4 – 5 фракций по 10 - 12 Гр) для обеспечения большой точности и эффективности контроля роста опухоли [27].

Тем не менее, как локальные, так и отдаленные рецидивы опухолей все еще имеют место в клинической практике после применения СЛТ [28].

Развитие отдаленных метастазов первичной опухоли является преобладающим типом рецидивов после лечения с использованием СЛТ, в то время как местные рецидивы наблюдаются примерно у 10 – 15% пациентов [29, 30].

В ряде исследований показаны различия в чувствительности клеток НМРЛ к радио- и химиотерапии в зависимости от их активности *p53* [31-34]. Однако роль *p53* в обеспечении устойчивости НМРЛ к фракционированному облучению еще до конца не выяснена.

1.2 Лучевая терапия мультиформной глиобластомы (ГБМ) человека

ГБМ является одной из наиболее агрессивных и распространенных первичных опухолей головного мозга у взрослых [35, 36]. Она составляет около 25% всех злокачественных опухолей нервной системы [37] и в 1,5 раза чаще встречается у мужчин [38]. ГБМ характеризуется неконтролируемой клеточной пролиферацией, высокой устойчивостью к гибели клеток и диффузной инфильтрацией [39]. Подавляющее большинство ГБМ (> 90%) – первичные, развиваются быстро у пациентов зрелого возраста (от 55 до 74 лет) и не имеют промежуточных менее злокачественных стадий. В этих возрастных группах больных ежегодная заболеваемость составляет около 4 на 100 000 населения [40]. Две трети пациентов с таким диагнозом имеют историю болезни менее 3 месяцев [41].

Недавние исследования показали, что амплификация и сверхэкспрессия являются отличительной чертой первичных ГБМ. В 2008 г. многие известные молекулярные особенности ГБМ, включая гомолог фосфатазы и тензина (PTEN), TP53, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR),

ретинобластому 1 (Rb1), нейрофибромин 1 (NF1), ERBB2, регуляторную субъединицу 1 фосфоинозитид-3-киназы (PIK3R1), регуляторную субъединицу альфа фосфоинозитид-3-киназы (PIK3CA) [42], p16 и фактор роста тромбоцитов альфа (PDGFRA) были отобраны и описаны проектом «Атлас Ракового Генома, TCGA» [43, 44]. Частота амплификации гена рецептора II типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2) при ГБМ составляет около 40%. Также высоко экспрессируются EGFRvIII [37].

Для ГБМ высокой степени злокачественности ЛТ является обязательным компонентом комплексного лечения. Высокая смертность больных связана с устойчивостью ГБМ к терапии, в большинстве случаев даже после хирургического удаления опухоли и последующего лечения сохраняется высокая вероятность рецидива заболевания [45]. Поэтому, понимание механизма, отвечающего за рецидив ГБМ, имеет большое клиническое значение [45]. У пациентов с ГБМ рецидивы возникают через относительно короткий период (медиана выживаемости без прогрессирования составляет от 5,5 до 13 месяцев), и примерно 90% рецидивов возникают в области высоких доз облучения [46]. Было показано, что ИИ может способствовать инвазивному поведению клеток ГБМ [47].

В настоящее время прогрессирование и рецидивы ГБМ связывают с ОСК [45]. Широкое распространение получила иерархическая модель структурной организации опухоли, при которой вся опухоль развивается из одной клетки [45, 48-51].

ЛТ, которую необходимо начать в течение 6 недель после операции, обязательна практически для всех пациентов с ГБМ [37]. Дальнейший анализ взаимосвязи между выживаемостью и дозой облучения выявил взаимосвязь доза-эффект, при этом дозы 60 Гр обеспечивают лучшую выживаемость пациентов по сравнению с более низкими дозами [52]. С современным

компьютерным обеспечением доза 60 Гр доставляется за 30 фракций в течение 6 недель в объеме, определяемым как кольцо ткани диаметром 2 - 3 см, окружающее периметр контрастирующего очага в предоперационных КТ/МРТ. Эскалация дозы более 60 Гр не представляется оправданной из-за отсутствия повышенного эффекта и высокого риска поздней инвалидизирующей нейротоксичности по типу С. Сокращенное общее время лечения, достигаемое за счет более высоких доз за фракцию и более низкой кумулятивной дозы (до 30 - 45 Гр), подходит для индивидуального клинического применения на основе типа R в случаях с короткой ожидаемой продолжительностью жизни [53]. Рандомизированное исследование, проведенное на 77 пациентах с ГБМ старше 70 лет, продемонстрировало преимущество ЛТ (50 Гр, 1,8 Гр за фракцию) в выживаемости пациентов по сравнению с поддерживающей терапией (29,1 недели против 16,9 недели, HR 0,47) без снижения качества жизни [54]. У пациентов с ГБМ в возрасте ≥ 60 лет рандомизированное исследование не выявило различий в выживаемости пациентов между режимами ЛТ 40 Гр/15 фракций и 60 Гр/30 фракций [55].

СЛТ (или радиохирургия) включает использование многоплоскостных фильтров для рентгеновских лучей, производимых линейным ускорителем или источниками кобальта (гамма-нож), чтобы доставить большую и высокосфокусированную дозу к опухоли с незначительным распределением дозы на окружающие нормальные ткани [56]. Для пациентов со злокачественной ГБМ, имеются доказательства, того что использование бустерной радиохирургии с последующей дистанционной ЛТ и химиотерапией (1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина) не дает преимуществ с точки зрения общей выживаемости, локального контроля головного мозга или качества жизни по сравнению с дистанционной ЛТ и химиотерапией. Использование бустерной радиохирургии связывают с

повышенной токсичностью [56]. Введение радиосенсибилизатора RSR13 (30 минут до сеанса облучения) с одновременной ингаляцией кислорода снижает токсичность [57].

1.3 Гетерогенность и пластичность опухолевых клеток

Все больше литературных данных подтверждает гипотезу о том, что опухоли представляют собой сложные гетерогенные органоподобные системы с иерархической клеточной организацией, а не просто скопления гомогенных опухолевых клеток [58]. НМРЛ [59] и ГБМ [60] характеризуются гетерогенной клеточной популяцией с различными биологическими свойствами и генетическими изменениями. ЛТ может привести к избирательному росту злокачественных клеток внутри опухоли, которые претерпевают сложную Дарвиновскую эволюцию и приобретают химио- и радиорезистентность [61]. Поскольку гетерогенность опухолевых клеток по морфологическим и функциональным признакам, в том числе по чувствительности к радиационным и химическим воздействиям, является фундаментальным свойством злокачественных опухолей, она во многом определяет эффективность лечения онкологических больных [9]. Более того, описана гетерогенность опухолевых клеток по составу клеточных мембран; их антигенов; спектру маркеров клеточной поверхности, включая рецепторы ростовых факторов; по активности сигнальных путей, регулирующих пролиферацию, клеточный цикл, репарацию ДНК, апоптоз, функциональный ответ клеток на изменения условий внешней (внеклеточной) среды [62-64]. Гетерогенность опухоли является основной преградой на пути к диагностике опухолей, успешному прогнозу и разработке противоопухолевых методов лечения [65].

Различают следующие формы гетерогенности опухолей: межопухолевая - разные (первично множественные) опухоли в одном органе могут иметь различный фенотип; внутриопухолевая — каждая отдельная опухоль состоит из фенотипически и функционально гетерогенных опухолевых клеток с неодинаковым поведением [66]. Благодаря внутриопухолевой гетерогенности, разные клетки опухолевой ткани обладают разным уровнем чувствительности к применяемому лечению [67]. Внутриопухолевая гетерогенность стимулирует развитие опухоли и способствует резистентности к терапии и рецидиву опухоли [67]. Для объяснения этого явления, были предложены две модели - модель клональной эволюции и модель ОСК. Модель клональной эволюции предполагает, что опухолевые клетки накапливают генетические изменения благодаря нестабильности генома. Эти изменения позволяют клеткам приобретать полезные характеристики в ходе отбора в дарвиновском эволюционном процессе [68]. Модель ОСК предполагает, что внутри опухоли небольшая субпопуляция клеток проявляет свойства самообновления и пластичности, а также способности восстанавливать гетерогенную популяцию опухолевых клеток [69].

В последнее время, теория ОСК предложила потенциальное объяснение рецидивирующим и устойчивым к терапии типам многих опухолей [70]. Гетерогенность клеток опухоли по пролиферативному потенциалу также указывает на аналогию с нормальными стволовыми клетками, ведь известно, что стволовые клетки асимметрично делятся, давая начало новой стволовой клетке и более дифференцированному предшественнику, у которого пролиферативный потенциал гораздо ниже [71, 72].

1.4 Опухолевые стволовые клетки (ОСК) и их возможная роль в возникновении и прогрессировании опухолей

Некоторые исследователи придерживаются мнения, что опухоль — это своеобразная иерархическая система, на вершине которой находятся ОСК [72]; в различных литературных источниках их называют также называемые опухоль-инициирующими (tumor initiating cells) или стволовоподобными (stem-like cells) клетками [9].

Концепция ОСК сформировалась еще в 1970-х гг. [73]. ОСК составляют малую долю общей популяции опухолевых клеток, обладают наиболее высокой пролиферативной и миграционной активностью среди клеток опухоли [74], селективно поддерживают способность к онкогенезу, а также пополняют гетероморфную массу более дифференцированных опухолевых клеток [75]. Они сходны со стволовыми клетками нормальных тканей по ряду молекулярно-биологических и структурно функциональных особенностей (профиль генной экспрессии, набор белковых маркеров на поверхности клеток, интенсивное выведение лекарственных препаратов и липофильных красителей (например, АВС-транспортеров) [76, 77]

В гипотезе ОСК, ОСК претерпевает симметричное или асимметричное деление с образованием двух новых ОСК или дифференцированной дочерней клетки и «самообновленной» ОСК. Основываясь на модели ОСК, способность инициировать онкогенез и генерировать гетерогенность в первичных опухолях полностью приписывается популяции ОСК. Только тогда, когда ОСК будут полностью погибнут в ходе ЛТ, опухоль может быть окончательно элиминирована. Более того, неэффективная ЛТ может «пробудить» покоящиеся ОСК для вступления в клеточный цикл, способствуя рецидиву и

трансформации опухоли в метастатический фенотип, что в конечном итоге может привести к метастазированию опухоли [78] (Рис. 1.1).

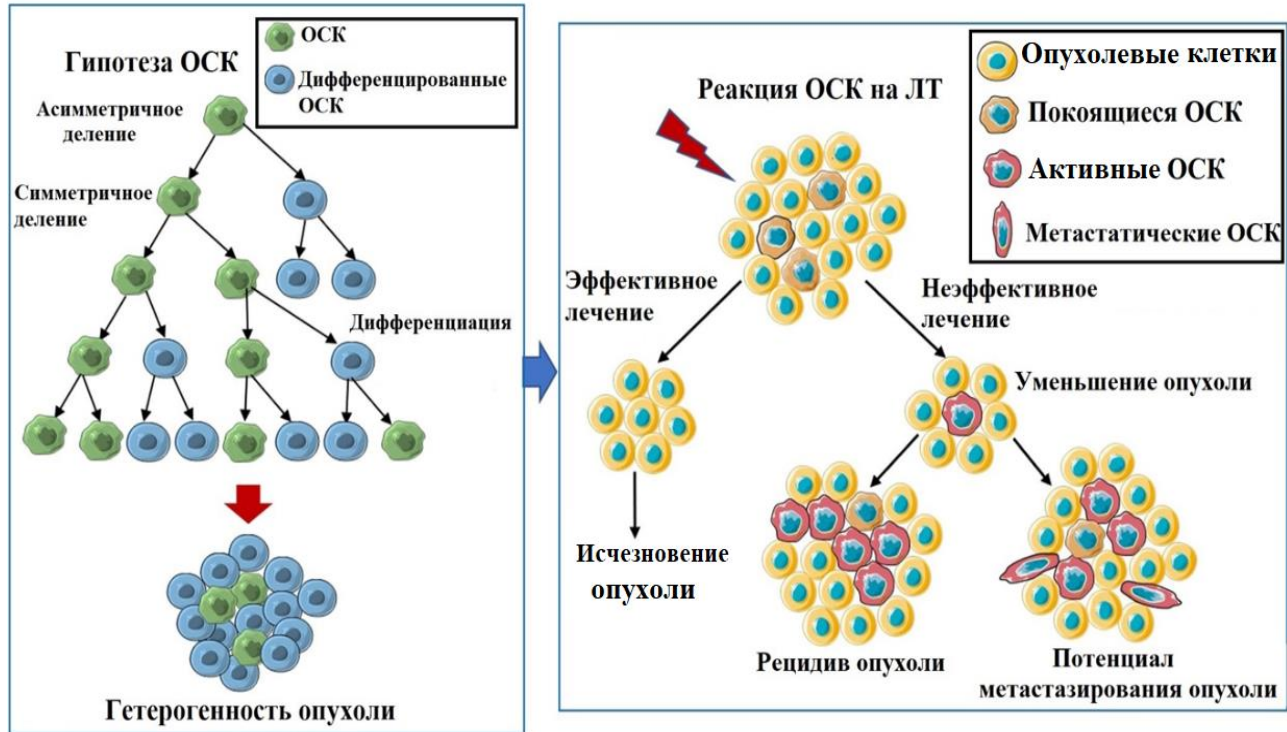


Рисунок 1.1. Реакция ОСК на ЛТ.

Существование ОСК связывают как с наличием внутренних (эффективность репарации ДНК, генерация активных форм кислорода (АФК), фаза клеточного цикла, уровни аутофагии и апоптоза, особенности регуляции сигнальных путей отвечающих за выживаемость клеток), так и внешних факторов-детерминант (например, влияние гипоксического микроокружения опухоли (МО) [79]. Примечательно, что клетки с фенотипом ОСК в солидных опухолях концентрируются в зоне инвазии [80]. Много исследований поддерживают идею о том, что ОСК могут обладать механизмами устойчивости к гибели, вызванной радио - и химиотерапией, что позволяет им выжить и вызвать рецидив опухоли. К настоящему времени ОСК описаны при

лейкозах, раке молочной железы (РМЖ), легкого, предстательной железы, кишечника, желудка, поджелудочной железы, головы и шеи, эндометриоза яичников, остеосаркоме, опухолях мозга и других солидных опухолях.

Исследователи по определению ОСК часто следовали общему принципу: разделение всех клеток опухоли на отдельные субпопуляции на основании экспрессии определенных молекул (маркеров) с последующим подтверждением наличия свойств ОСК у одних и отсутствия или малой степени выраженности таковых у других, т.е. выявление ОСК было неразрывно связано с определением их маркеров. В качестве последних используются разнообразные по функциям молекулы (поверхностные антигены, ферменты, рецепторы, элементы сигнальных путей, необходимых для поддержания стволовости) [81]. При этом следует подчеркнуть, что понятия ОСК и «клетка, экспрессирующая маркеры ОСК», не идентичны, так как первое отражает преимущественно функциональные свойства клеток, а второе — морфологические, и наличие свойств ОСК у клеток, экспрессирующих маркеры ОСК, требует доказательства [81].

Экспрессия маркеров ОСК позволяет прогнозировать ответ на терапию и выделять субпопуляции клеток с различной чувствительностью к ней. ОСК изолируют из солидных опухолей с использованием различных маркеров СК, включая CD34 [82, 83], CD133, CD24, CD44 [84], CD29 [85] и CD31 (PECAM) [71, 83-86]. Опухолевые клетки, несущие маркеры CD133+, CD44+, CD166+, ALDH+ и молекулу адгезии эпителиальных клеток (EPCAM+) демонстрируют 100-кратное увеличение способности инициировать опухоль [74]. ОСК в раке легкого идентифицируют как субпопуляцию клеток, которые экструдируют краситель Hoechst 33342 (побочная популяция, SP) [87], а также как CD133+ клетки [71] или ALDH+ клетки [88, 89]. Помимо CD133 на поверхности ОСК ГБМ экспрессируют другие маркеры, такие как CD15, A2B5, молекулы

адгезии L1CAM [90], нестин, подопланин (PDPN) и интегрин альфа 6 (CD49f) [91].

Известно, что аутокринные/паракринные сигнальные каскады, такие как Wnt, Notch, Hedgehog (Hh), трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) и рецепторные тирозинкиназы (например, c-MET, EGF, PDGF), играют важную роль в поддержании популяции ОСК и активации механизмов дедифференцировки в трансформированных клетках [92-97].

ОСК демонстрируют повышенную регуляцию ответа на повреждение ДНК (DDR), включая усиление передачи сигналов контрольных точек и рекрутирование белков репарации ДНК [98].

Установление феномена «слияния» ОСК глиом человека с непораженными клетками мозга мыши в определенной степени объясняет высокую скорость роста опухолевых узлов вследствие вовлечения в процесс малигнизации и пролиферации непораженных клеток хозяина. Было высказано предположение о том, что после слияния ОСК с непораженными клетками химерные гибридные новые клетки сохраняют частично свои гистологические свойства, поэтому образуются различные типы опухолей. Способность ОСК к слиянию с интактными клетками считают признаком их высокой злокачественности, а возникающие гибридные клетки должны быть еще более злокачественными, в частности, обладать большей способностью к инфильтративному росту.

Было показано, что ОСК создают новую сосудистую сеть с малым количеством эндотелиальных клеток в микрососуде мозга мышей [49, 77, 99].

Пластичность ОСК, процесс, сильно зависящий от ЭМП и связанный с дедифференцировкой клеток, ответственен за метастазы, рецидивы, неэффективность ЛТ и неблагоприятный прогноз у онкологических больных [100]. Таким образом, ОСК имеют ряд особенностей, понимание которых

может иметь большое значение для совершенствования подходов при создании инновационных технологий противоопухолевой терапии злокачественных глиом [101].

Важно отметить, что при разработке препаратов, направленных против ОСК, нужно учитывать влияние проводимой терапии на нормальные СК [101].

1.5 Перекрестные взаимодействия между ОСК и их нишами

Необходимо отметить, что ОСК располагаются в нишах, которые представляют собой анатомически различные области в МО (Рис.1.2).

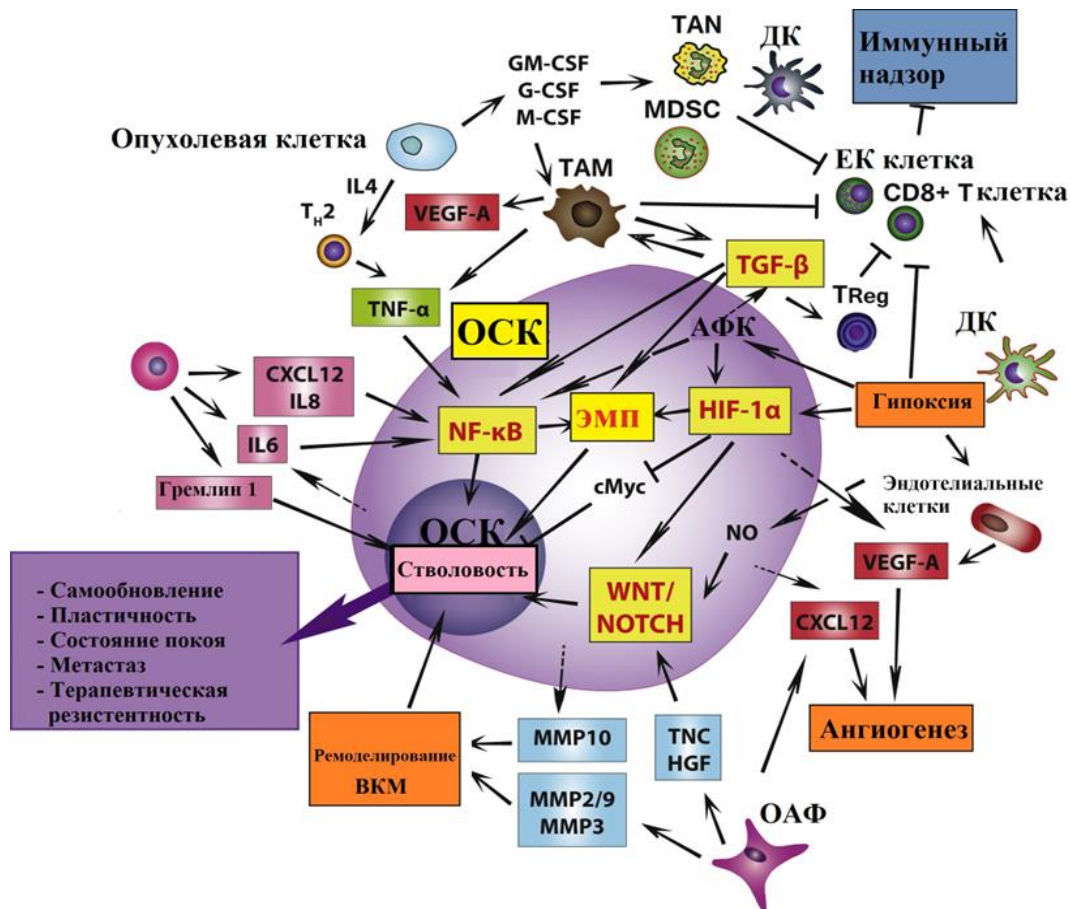


Рисунок 1.2. Молекулярная и клеточная основа перекрестных взаимодействий между ОСК и их нишами [104].

Эти ниши с характерным МО и васкуляризацией поддерживают основные свойства ОСК: пластичность фенотипа, адгезию, выживание и резистентность

к стандартному противоопухолевому лечению [101]. Клетки в нише ОСК продуцируют факторы, которые стимулируют самообновление ОСК, индуцируют ангиогенез и рекрутируют иммунные и другие стромальные клетки, которые секретируют дополнительные факторы, способствующие инвазивности и метастазированию опухолевых клеток, как описано Oskarsson с соавт.[102] и Ye с соавт.[103]. Секретируя CXCL12, IL6 и IL8, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) способствуют стволовости опухолевых клеток за счет активизации ядерного фактора «каппа-би» (NF-κB), тогда как ОСК секретируют IL6 для привлечения большего количества МСК. МСК также продуцируют антагониста, грелина 1, для поддержания недифференцированного состояния. Окружающие опухолевые клетки продуцируют IL4 для накопления клеток Т хелперов 2 (ТН2), которые продуцируют фактор некроза опухоли альфа (TNFα) для усиления сигнального пути NF-κB, способствуя созданию проопухолевого МО. В таком МО, опухолевые клетки продуцируют M-CSF, GM-CSF и G-CSF, вызывая экспансию опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ), супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), опухоль-ассоциированных нейтрофилов (ТАН) и дендритных клеток (ДК). ТАМ продуцируют TNFα и TGF-β для стимуляции TGF-β- или NF-κB-зависимого ЭМП и, таким образом, повышает пластичность ОСК. TGF-β также может напрямую взаимодействовать с сигнальными путями NF-κB для дальнейшего повышения стволовости опухолевых клеток. Кроме того, TGF-β, продуцируемый ТАМ, накапливает регуляторные Т-клетки (Treg). ТАМ, Treg и гипоксическая среда ингибируют иммунный надзор, подавляя цитотоксическую активность CD8+ Т клеток и естественных киллеров клеток (ЕК), а также фагоцитоз макрофагов. В первичной опухоли, гипоксия развивается за счет нарушения васкуляризации. Кроме того, гипоксия увеличивает продукцию АФК и

индуцирует ЭМП через сигнальный путь TGF- β . Как гипоксия, так и АФК индуцируют экспрессию HIF-1 α ОСК, непосредственно стимулируя ЭМП, и усиливают стрессорные сигнальные пути ОСК, повышая выживаемость опухолевых клеток и поддерживая их стволовость. Более того, гипоксия ингибирует пролиферацию клеток путем подавления экспрессии c-Мус. HIF-1 α обеспечивает поддержание СК в недифференцированном состоянии через TGF- β и Wnt сигнальные пути. ОСК и опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) продуцируют CXCL12 для стимуляции ангиогенеза, а гипоксия заставляет как ОСК, так и эндотелиальные клетки продуцировать VEGF, который интенсивно индуцирует ангиогенез. Эндотелиальные клетки способствуют самообновлению ОСК путем прямого межклеточного контакта или продукции оксида азота (NO) через сигнальный путь Notch. ОАФ продуцируют Тенаскины -С (TNC) и HGF для усиления передачи сигналов Wnt и Notch и поддержания ОСК. ОАФ также продуцируют MMP2, 3 и 9. Наряду с MMP10, продуцируемым ОСК, эти MMP способствуют деградации и ремоделированию внеклеточного матрикса (ВКМ), усиливая ЭМП и состояние ОСК. МСК и ОСК продуцируют ангиогенные факторы для стимуляции ангиогенеза. В первичной опухоли секретируются различные хемокины и цитокины для рекрутирования MDSC, TAM и TAN. Эти проонкогенные и прометастатические клетки подавляют цитотоксические функции ЕК-клеток и CD8⁺ Т-клеток и ингибируют иммунный надзор. Трег-клетки накапливаются TAM для дальнейшего снижения цитотоксичности Т-клеток. TAM, ОАФ, новообразованные кровеносные сосуды и другие стромальные клетки накапливаются на инвазивном фронте, где ОАФ секретируют M-CSF для включения проангиогенного переключателя TAM. TAM подавляют экспрессию антиангиогенного фактора и секретируют VEGF-A и WNT для стимуляции ангиогенеза. CXCL12, секретируемый ОАФ,

запускает петлю EGF-M-CSF, в которой опухолевые клетки стимулируют TAM к продукции EGF путем секреции M-CSF, тогда как активированный клеточный рецептор EGF в ОСК увеличивает их инвазивность. При физическом контакте с тромбоцитами ОСК подвергаются ЭМП и становятся метастатическими стволовыми клетками (MetСК). Также на инвазивном фронте Wnt, Notch, TNF- α , TGF- β и другие цитокины, секретируемые стромой опухоли, поддерживают выживание MetСК. Тем временем TAM и ОСК высвобождают экзосомы и факторы, чтобы установить преметастатические ниши для выживания прибывающих опухолевых клеток. Экзосомы также способствуют устойчивости опухолевых клеток к лекарственным препаратам. Кровеносные сосуды, тромбоциты окружают и предотвращают гибель MetСК в суровой и чужеродной среде. ОСК могут захватывать нормальные ниши СК, установленные МСК. Ниша нормальных СК имеет различные факторы, такие как TGF- β и различные клетки, которые поддерживают стволовость ОСК и поддерживают их выживаемость. В нише ОСК могут усиливать пути ЭМП в окружающих неопухолевых клетках и трансформировать их в ОСК для колонизации новой ниши. Первичная опухоль выделяет VEGF-A, TGF- β , TNF- α и LOX, индуцирующие экспрессию хемотаксического белка S100A и ремоделирование ВКМ в местах метастазирования, что способствует созданию предметастатической ниши. Новообразованные кровеносные сосуды экспрессируют фибронектин и VCAM для привлечения воспалительных моноцитов моноциты IMs для секреции MMPs для метастатического роста. Интегрины и NET облегчают миграцию ОСК, что поддерживается активацией периостина и TNC. Между тем, LOX и S100A активно задействуют MDSC, чтобы способствовать метастатическому росту. ОСК инициируют свой метастатический рост вокруг кровеносных капилляров, созданных периваскулярными нишами, обогащенными

ангиокринными факторами, такими как VEGF-A. Когда ниша установлена, ОСК привлекают ТАМ, ОАФ и другие стромальные клетки для создания паракринных петель для снабжения ОСК TNF- α , TGF- β и IL для поддержания ОСК. В то же время окружающие стромальные клетки секретируют MMP и катепсины для дальнейшего разрушения ВКМ, что, в свою очередь, высвобождает TGF- β и различные факторы роста, такие как VEGF-A, что способствует росту опухоли [104]. Было показано, что измененные сигнальные пути (Notch, Hh-Gli, Wnt/ β -катенин, TGF- β / SMAD, PI3K/Akt/mTOR) и экспрессия молекулярных маркеров (CD49f, SDF1, VEGF, CD44, CD34) направлены на поддержание существования ниш ОСК ГБМ [101].

1.6 Процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП)

ЭМП является ключевым процессом, при котором поляризованные эпителиальные клетки теряют свои плотные межклеточные контакты, что приводит к повышению их миграционной способности, усилению инвазивных свойств и приобретению мезенхимного фенотипа [105, 106]. Ключевым событием в процессе ЭМП является так называемое переключение кадгеринов (cadherin switch) — снижением экспрессии центральной молекулы межклеточных адгезионных контактов E-кадгерин и повышение уровня мезенхимальных маркеров, таких как N-кадгерин, Виментин и фибронектин, а также высвобождение β -катенина, его ядерная транслокация, что, собственно, способствует эпителиально-мезенхимальной трансформации [105, 107-110]. Кроме этого, опухолевые клетки секретируют повышенное количество матрикс деградирующих протеаз для разрушения внеклеточного матрикса и облегчения миграции клеток [111]. Более того, при утрате E-кадгерина β -катенин транспортируется в ядро, где он может активировать некоторые

звенья Wnt сигнального каскада, который играет важную роль в поддержание фенотипа ОСК ряда злокачественных опухолей [112]. Известен ряд факторов, которые могут индуцировать ЭМП, например, транскрипционные факторы Slug, Twist, Snail, Zeb1, Sip-1 [113], а также цитокины VEGF и TGF- β [114-116].

При ЭМП клетки приобретают веретеновидную форму, способность к миграции, что сближает их с мезенхимальными [117]. Накапливается все больше доказательств того, что приобретение фенотипа стволовых клеток тесно связано с изменениями, происходящими при ЭМП [118-120]. Действительно, было показано, что доля ОСК увеличивается в популяции трансформированных клеток с экспериментально-индуцированным ЭМП [121]. Также показано, что клетки, прошедшие ЭМП, имеют повышенную устойчивость к ЛТ, а профиль экспрессии генов в таких клетках частично сходен с таковым в «стволовом» состоянии [113, 122]. В 2008 г. Вайнберг с соавт. пришли к выводу, что как СК, так и ОСК рака молочной железы человека экспрессируют высокие уровни молекулярных маркеров, традиционно связанных с ЭМП, таких как N-кадгерин и FOXC2. В соответствии с этим наблюдением индукция перехода эпителия к мезенхиме в клетках рака молочной железы приводит к повышенной регуляции маркеров, связанных с состоянием стволовых клеток [106].

В настоящее время ясно, что ЭМП не только запускается из программы внутри опухолевой клетки, но также зависит от сигналов МО – внеклеточного матрикса, сосудистой системы, воспалительных клеток и фибробластов, так как специфические виды рака, несомненно, предпочитают конкретные сайты для метастазирования [105].

Недавние исследования продемонстрировали ключевую роль FRA1 (FOS-родственный антиген-1) в процессе ЭМП и метастазировании опухолей [123-126]. Повышение уровня экспрессии FRA1 происходит при многих видах

опухолей, включая опухоли молочной железы, мочевого пузыря, толстой кишки, пищевода, а также опухоли головы и шеи (ОГШ) [123-129]. Было подтверждено, что сверхэкспрессия FRA1 в ткани опухоли легкого коррелирует с нарушением регуляции сигнального пути p53 [130].

Было обнаружено, что выжившие после облучения клетки НМРЛ A549 and H460 экспрессируют значительно более высокие уровни маркеров ОСК (CD24 и CD44), ядерного β -катенина и маркеров ЭМП (Snail1, Виментин и N-кадгерин) по сравнению с необлученными клетками [131]. Экспрессия E-кадгерина почти отсутствует в нервных тканях, где его экспрессия ограничена клетками ОСК ГБМ и субпопуляцией высокоагрессивных клеток ГБМ, тогда как N-кадгерин в высокой степени экспрессируется в астроцитах, где он способствует регулированию клеточной полярности и миграции, а также в клетках ГБМ, которые демонстрируют более быстрое и менее направленное движение по отношению к астроцитам [132].

1.7 Основные механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК и их роль в судьбе клетки

Восстановление структуры ДНК необходимо для поддержания целостности генома [133]. ИИ вызывает остановку репликационных вилок, появление повреждений ДНК и активацию ответа на повреждение ДНК (DDR) [134, 135]. Двунитевые разрывы (ДР) ДНК считаются наиболее критическими первичными радиационными повреждениями структуры ДНК, поскольку мутантные клетки млекопитающих, дефектные по репарации ДР, особенно чувствительны к воздействию ИИ [136]. В клетке в ходе ответа на действие ИИ наблюдается образование так называемых радиационно-индуцированных фокусов белков репарации ДНК (от англ. foci) [137].

В клетках высших эукариот ДР быстро инициируют фосфорилирование корового гистона H2AX по серину-139 с образованием γ H2AX.

Фосфорилированная форма гистона γ H2AX является одними из наиболее распространенных маркеров ДР для всех разрывов, тогда как белок Rad51 является специфическим маркером тех ДР, репарация которых осуществляется по пути гомологичной рекомбинации [138]. Фосфорилирование H2AX происходит уже в первую минуту после облучения [139] и осуществляется киназами, относящимися к семейству фосфатидилинозитол-3-киназ: ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) и DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) [140, 141]. Количество фокусов γ H2AX отражает количество ДР, принято считать, что фокусы γ H2AX локализуются в местах репарации одиночных или множественных ДР ДНК [137].

Нерепарированные или неправильно репарированные ДР ДНК могут приводить к образованию хромосомных aberrаций и гибели клеток, соответственно [142, 143].

В клетках млекопитающих репарация ДНК от ДР осуществляется с помощью двух канонических механизмов: негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация (HRR) и несколько альтернативных путей [144]. В отличие от нормальных клеток, для которых важна точность репарации ДНК, опухолевым клеткам необходима эффективность репарации, но не ее точность [145].

NHEJ и HRR имеют значительно различающуюся кинетику. Наибольший вклад в репарацию вносит процесс NHEJ, ответственный за процессинг более чем 80 % всех ДР, образованных в результате действия ИИ [146]. NHEJ может быть безошибочным или подверженным ошибкам процессом, способным соединить концы двухцепочечной ДНК без гомологичных последовательностей или с небольшой гомологией [147]. Как HRR, так и NHEJ регулируются PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) [147]. В

клетках человека, АТМ участвует как в HRR, так и в NHEJ через процессы контроля клеточного цикла и хроматин-ассоциированные процессы [148]. Более того, NHEJ напрямую координируется DNA-ПК, холофермента, состоящий из регуляторного гетеродимера KU, KU70 и KU80, и большой каталитической субъединицы DNA-ПКcs [147]. DNA-ПК связывается с поврежденной ДНК напрямую и функционируют как молекулярная структура защищающая концы ДНКи как киназа для рекрутирования других факторов NHEJ к месту повреждения [149]. Образование комплекса активной киназы вызывает фосфорилирование других белков, участвующих в пути репарации, таких как RPA2, WRN, XLF/Cernunnos, DNA Лигазы IV (LigIV) и XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4), PAXX (паралог XRCC4 и XLF), а также автофосфорилирование DNA-ПКcs [150, 151]. DNA-ПКcs также связывается с эндонуклеазой Artemis и регулирует ее активность, возможно, участвующую в предварительном лигировании процессинга концов ДНК, особенно если они содержат сложные повреждения [152]. Этот путь называется «классическим» или «каноническим» D-NHEJ (DNA-ПК dependent non-homologous end joining). NHEJ является независимым от клеточного цикла и быстрым процессом [153]. Скорость, с которой этот путь завершает довольно сложный набор последовательных реакций - 50% ДР за 15 - 30 минут. Животные, дефектные по p53 и компонентам D-NHEJ обладают повышенным риском возникновения опухолей [154].

Подробное изучение альтернативных путей NHEJ в клетках млекопитающих было проведено Лопесом и сотрудниками [155]. Альтернативный путь соединения концов V-NHEJ активно работает с более медленной кинетикой и в основном в качестве резерва D-NHEJ [156]. Множество подходов, используемых для документирования функции этой «новой» формы NHEJ, также привело к множеству терминов, используемых

для её описания. К ним относятся альтернативные NHEJ (A-NHEJ или alt-NHEJ), опосредованное микрогомологией соединение концов (MMEJ), KU-независимое соединение концов, LigIV-независимый NHEJ [157-161]. Генетические и биохимические эксперименты указывают на функциональную важность ДНК-лигазы III (LigIII) для пути V-NHEJ [162]. LigIII функционирует в комплексе с XRCC1 и регулируется PARP1 [163]. Также, комплекс LigIII/XRCC1/ PARP1 участвует в других процессах репарации ДНК, таких как однонитевые разрывы и модифицированные основания ДНК [163]. Идентификация PARP1 как предполагаемого компонента V-NHEJ и связывание этого фермента с концами ДНК позволяют предположить возможную конкуренцию с KU.

KU, в дополнение к его функции по рекрутированию DNA-ПКcs, также помогает выровнять концы ДНК перед лигированием и уменьшает подвижность концов ДНК [164, 165]. Имеются доказательства того, что гистон H1 вносит вклад в V-NHEJ, возможно, выполняя сходные функции выравнивания. Ряд работ указывает на причастность комплекса MRN, состоящего из белков MRE11, Rad50 и NBS1 для пути V-NHEJ [166]. Поскольку в клетках с дефектами DNA-ПКcs и других компонентов D-NHEJ резко увеличивается частота хромосомных aberrаций после воздействия ИИ, можно сделать вывод, что V-NHEJ приводит к ошибкам [167].

Для HRR необходима сестринская хроматида, которая используется в качестве матрицы для репарации поврежденной хроматиды, содержащей ДР. Поэтому репарация по пути HRR активна преимущественно в S и G2 фазах клеточного цикла [168]. HRR является причиной активации контрольной точки G2 при облучении в клинически значимых дозах ИИ [169]. Было показано, что в клетках, облученных в G2-фазе в относительно низких дозах (< 1 Гр) по пути HRR репарируется около 50% ДР, но с увеличением дозы (>8

Гр) вклад HRR уменьшается и становится незначительным [170]. Эффективность HRR зависит от многочисленных белков и белковых комплексов, например, BRCA2 (ген рака молочной железы 2) и Rad54. BRCA2 является супрессором опухолей и одним из важнейших белков, регулирующих HRR; он способствует связыванию Rad51 с одноцепочечной ДНК во время процессинга повреждений ДНК [171, 172].

Rad54 индуцирует синтез ДНК и способствует диссоциации Rad51 от цепи ДНК, обеспечивая отжиг синтезированной ДНК с концами поврежденной цепи ДНК. В этом контексте 53BP1 (p53-связывающий белок 1) функционирует как сенсор повреждения ДНК и регулятор выбора пути репарации ДНК, способствуя NHEJ [172].

Вовлечение ATM и ATR в регуляцию контрольных точек при облучении в относительно низких дозах ИИ (~1 Гр) требует наличия функционального HRR [169]. Клетки с дефицитом HRR активируют слабую, но легко обнаруживаемую ATM/ATR-зависимую контрольную точку G2 при облучении в более высоких дозах (более 4 Гр) [169]. Мутанты HRR показывают отсутствие обнаруживаемого дефекта в элиминации ДР в широком диапазоне доз ИИ при анализе с помощью PFGE или другого физического метода обнаружения [173].

1.8 Радиационно-индуцированное преждевременное старение (сенесценция) опухолевых клеток

Клеточное старение — это состояние остановки клеточного цикла, при котором пролиферирующие клетки становятся устойчивыми к факторам, стимулирующим рост [174, 175]. Однако, «стареющие клетки» остаются долгое время метаболически активными [175]. Важный этап исследования клеточного старения датируется началом 1970-х годов, когда независимо друг от друга Olovnikov and Watson описали проблему концевой недорепликации

ДНК [176, 177]. Согласно этой гипотезе, при каждом клеточном делении происходит укорочение 5'-концевой дочерней цепи ДНК, что в конечном итоге приводит к достижению лимита Хейфлика. Как следствие, была сформулирована теломерная теория, согласно которой именно укорочение теломер опосредует репликативное старение клеток [177]. Примерно в это же время стали появляться работы, свидетельствующие о существовании другого типа старения, независимого от длины теломер [178, 179]. Этот тип старения носит название стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS), так как признаки старения проявляются в клетках на ранних пассажах задолго до наступления репликативного старения клеток под воздействием разнообразных стрессорных факторов, а также сверхэкспрессии онкогенов [180-182].

Интересно, что репликативное старение клеток и SIPS являются схожими по морфологическим признакам и молекулярно-клеточным биомаркерам старения. Однако разница между репликативным старением клеток и SIPS, по-видимому, связана со временем проявления этих признаков. При этом, репликативное старение клеток программируется в определенное время, когда обнажаются концы теломерной ДНК, в то время как SIPS не программируется, а является реакцией на данный стресс [183, 184].

Как облученная, так и старая клетки теряют способность удваивать ДНК и блокируются в G1/S фазе клеточного цикла [185]. Несмотря на снижение пролиферативного потенциала, стареющие клетки проявляют высокую метаболическую активность. Было показано, что в стареющих клетках превалирует гликолитическое состояние даже в присутствии высоких уровней кислорода [186].

Стареющие клетки приобретают старение ассоциированный секреторный фенотип (SASP) [187-189]. Термин SASP впервые использовали в 2008 г. для

обозначения факторов, секретируемых стареющими клетками, включая цитокины, хемокины и факторы роста, вызывающие изменения в микроокружение клеток (например, изменения в составе внеклеточного матрикса и иммунном микроокружении) [187-189]. По молекулярным механизмам факторы SASP можно разделить на следующие группы [190].

- 1- **Факторы, связывающиеся с рецептором.** В состав данной группы входят растворимые сигнальные молекулы, к которым относятся цитокины, хемокины и ростовые факторы. Эти факторы могут влиять на клетки микроокружения, взаимодействуя с соответствующими поверхностными рецепторами на их мембранах и таким образом запуская разные внутриклеточные сигнальные каскады [191, 192]. Наиболее известными представителями этой группы являются интерлейкины IL-6, IL-8, IL-1a, хемокины GRO α , GRO β , CCL-2, CCL-5, CCL-16, CCL-26, CCL-20 и факторы роста FGF, HGF, TGF β , GM-CSF.
- 2- **Факторы, действующие напрямую.** Эта группа включает матриксные металлопротеиназы MMP-1, MMP-10, MMP-3 и сериновые протеазы: тканевый активатор плазминогена (tPA) и урокиназный активатор плазминогена (uPA). В эту группу можно отнести и маленькие небелковые компоненты, к которым относятся АФК и азота, повреждающие соседние клетки [193].
- 3- **Регуляторные факторы.** В эту группу входят тканевые ингибиторы металлопротеиназы (TIMP), ингибитор активатора плазминогена (PAI) и белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (IGFBP). Эти факторы не имеют собственной ферментативной активности, однако, связываясь с факторами, входящими в первую и вторую группы, регулируют их функционирование [194].

Стареющие клетки, как известно, участвуют в различных стадиях развития опухоли [195]. Считается, что первая фаза секреции начинается сразу после повреждения ДНК и продолжается в течение первых 36 часов. SIPS индуцирует клеточный ответ на DDR [196], что приводит к выходу клеток из клеточного цикла [197]. Показано, что эти факторы SASP тесно связаны с МО и прогрессированием опухоли. SASP вызывает ангиогенез [198], ЭМП, а также хронический окислительный стресс и воспаление, стимулирующие пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток [199]. Например, известно, что IL6 и IL8, секретируемые стареющими клетками, могут стимулировать инвазию предопухолевых клеток, что приводит к вторичной опухоли [189, 200]. Более того, было показано, что CCL2, также известный как MCP1 важен для рекрутирования моноцитов, которые способствуют метастазированию рака молочной железы и коррелируют с неблагоприятным прогнозом [201]. GRO1 способствует миграции клеток рака [201]. Показано, что нокдауны таких участников DDR, как ATM, Chk2, NBS1, H2AX, снижают экспрессию и соответственно секрецию ряда факторов SASP, включая IL-6 и IL-8 [202, 203]. В то же время, было показано участие транскрипционного фактора GATA4 в DDR-зависимом механизме регуляции SASP [179]. Накопление GATA4 в стареющих клетках способствует инициации и поддержанию активности NF- κ B [179]. Было показано, что mTOR может контролировать трансляцию IL-1 α и таким образом регулировать SASP [204]. mTOR также контролирует трансляцию киназы MK-2, которая фосфорилирует специфический РНК-связывающий белок ZFP36L1, препятствуя деградации транскриптов различных компонентов факторов SASP [205]. Еще один возможный вариант участия mTOR в регуляции SASP связывают с присутствием на транс-стороне аппарата Гольджи особого компартмента

(TOR-autophagy spatial coupling compartment, TASC), в котором накапливаются аутолизосомы и mTOR во время старения [206].

Фенотип клеточного старения несёт выраженные морфологические, а также характерные изменения экспрессии генов. Так, показано, что стареющие клетки имеют увеличенную, уплощенную и неправильную форму (например, при гиперэкспрессии Виментина) с повышенной зернистостью и цитоплазмой богатой вакуолями [207]. Кроме того, эти клетки имеют морфологически измененные митохондрии [208, 209]. Одним из механизмов, лежащих в основе увеличения клеточного объема клеток, связанного со старением, является клеточная гипертрофия за счёт накопления белков [210]. В связи с этим также было предположено, что накопление белков в стареющих клетках может быть связано со снижением активности протеасомных пептидаз в сочетании с повышенным уровнем окисленных или убиквитинированных белков [211].

Общей характеристикой старения является накопление ингибиторов циклин-зависимых киназ p21 и p16 [212]. Кроме того индуцированная активность в ответ на воздействие ИИ подавляет экспрессию, отсрочивающего старение клетки [213].

Как известно также, что пероксид водорода (H_2O_2), одна из АФК, индуцирует p21 и активирует путь PI-3K/TOR/S6K, способствуя увеличению клеточного объема и старению клеток [214-216].

Стареющие клетки теряют целостность монослоя за счёт подавления межклеточных контактов [217, 218]. Более того, в стареющих клетках наблюдается накопление различных специфических аномалий, включая продукты окисления азотистых оснований ДНК (например, 8-оксо-2'-дезоксигуанозин) [219] и ассоциированные со старением гетерохроматиновые фокусы (SAHF) [207]. Изменения ДНК, связанные со старением, также происходят и на эпигенетическом уровне [220].

Стареющие клетки показывают повышенную цитоплазматическую активность лизосомальной β -галактозидазы (SA- β -Gal), биохимического маркера старения [207]. Стоит подчеркнуть, что в настоящее время, список маркеров старения выходит далеко за рамки SA- β -Gal, включая высокий уровень экспрессии ингибитора циклинзависимой киназы (CDK), p16^{INK4A} и p21^{Cip1} [221], секреторный фенотип SASP [222], липофусцин [223], фокусы гистона γ -H2A.X и SAHF [197]. Белки-супрессоры опухолей, такие как PTEN, p53 или гипофосфорилированный Rb, могут быть также использованы для обнаружения клеточного старения. Более того, можно использовать отсутствие некоторых маркеров для обнаружения клеточного старения, включая отсутствие белка-маркера пролиферации (Ki67) или отсутствие включения бромдезоксипуридина (BrdU) [174].

При воздействии ИИ (повреждения ДНК) киназа ATM фосфорилирует киназу Chk2, которая в свою очередь индуцирует функцию транскрипционного фактора P53, BRCA1 или представителей семейства CDC25 фосфатаз [224]. Облучение, как и старение сопровождаются фосфорилированием p38MAPK опосредующей сигналинг ведущей к старению клеток [225].

Является ли старение обратимым или необратимым явлением, это зависит от наличия белков p53 и p16 [226-229]. Leong с соавт. [230] продемонстрировали, что p53 подавляет p16 посредством Id1-независимых механизмов [231]. Кроме того, было высказано предположение того, что после облучения остановка клеточного цикла и старение зависят от p53/p21 каскада в клетках рака толстой кишки человека HCT116 [232]. Было сообщено, что p16 репрессируется p53-зависимым образом. Например, Hernandez Vargas с соавт. [233] сообщили, что p53 активирует белок-регулятор транскрипции Id1, который является репрессором p16^{INK4A} [234, 235].

В течении двух последних десятилетий появилось все больше доказательств того, что стареющие клетки причинно-вовлечены в прогрессировании опухоли. Эксперименты на животных показали, что стареющие клетки стимулируют образование опухоли молочной железы [236], колоректального рака [237], рака поджелудочной железы [238] и яичников [239] намного эффективнее по сравнению со своими молодыми аналогами (Рис.1.3). Их вклад включает формирование иммунодепрессивного тканевого микроокружения, например, посредством IL-6-зависимой стимуляции супрессивных миелоидных клетки и их способности ограничивать противоопухолевые Т-клеточные реакции [240]. Необходимо отметить, что SASP регулируется как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях. Ключевая роль в регуляции экспрессии компонентов SASP, включая IL-6, IL-8, CXCL1, CXCR2, отводится ядерному фактору NF- κ B [207, 241, 242]. Было показано что, воздействие умеренных доз генотоксических агентов (например, ИИ, UV, химиотерапевтические препараты, окислители) способствует высокой степени SIPS, а не только маргинальному апоптозу [231]. Эффекты ИИ в некоторой степени аналогичны процессам, наблюдаемым при наследственных прогероидных синдромах [184].

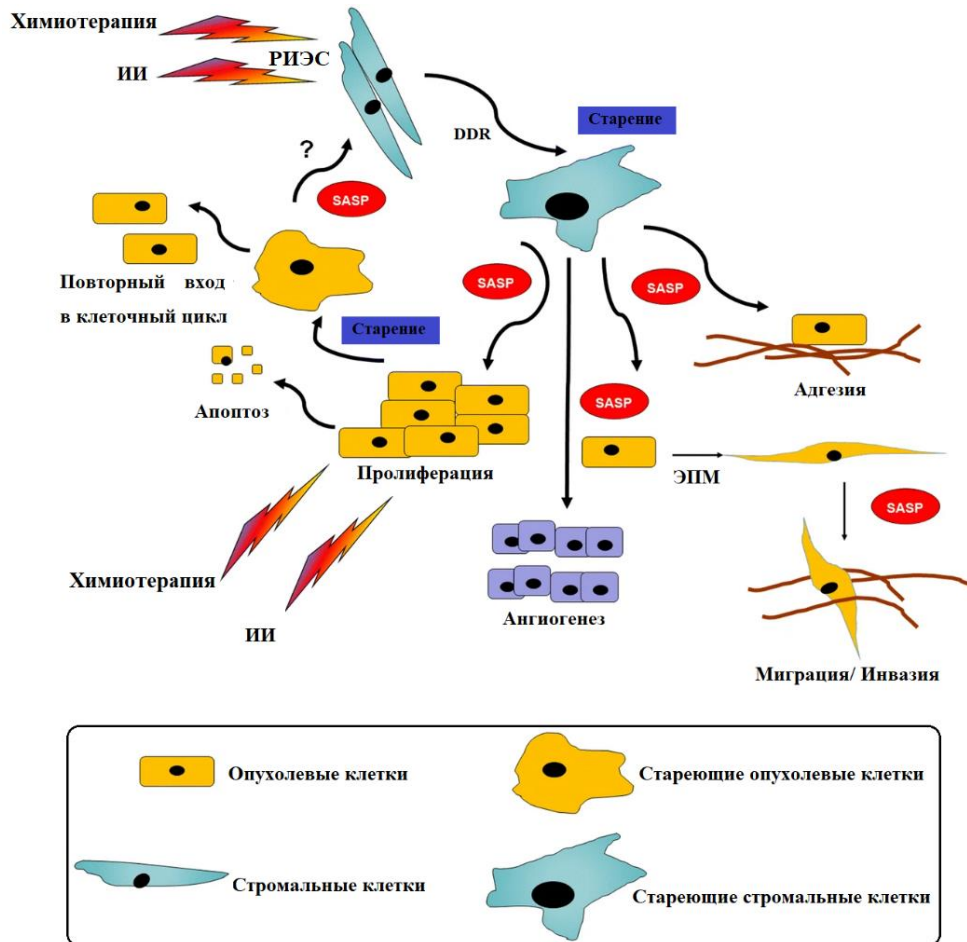


Рисунок 1.3. Гипотетический цикл модуляции опухоли за счет взаимодействия нормальных стромальных клеток с опухолевыми клетками, подвергающимися старению, индуцированному терапией.

Следует подчеркнуть, что облученные клетки в ответ на образование повреждений ДНК активируют точки контроля клеточного цикла по ATM/ATR-сигнальному пути, обуславливая задержку или остановку клеточного цикла в определенных фазах клеточного цикла. Активированные формы ATM/ATR регулируют активацию чекпойнтов клеточного цикла, ассоциированных со старением, главным образом через p53, Chk1 и Chk2 с участием p21, p16 и Rb [243]. Однако стоит отметить, что за повреждением

ДНК и замедлением (остановкой) клеточного цикла не обязательно следует клеточное старение [243], так как не исключаются полная репарация или апоптоз [244]. Реакции клеток на воздействие ИИ, особенно при низких дозах, включают также «немишенные» эффекты, такие как «радиационно-индуцированный эффект свидетеля, РИЭС» [245].

Показано, что ИИ вызывает временную остановку роста клеток НМРЛ, характеризующуюся старением, с последующим восстановлением пролиферативной активности этих клеток [246]. В 2013 г. Луо с соавт. показали, что доза 6 Гр не вызывает значительного апоптоза в клетках A549 и H460, а, наоборот, радиационно-индуцированное старение [247]. Кроме того, накоплено множество данных, показывающих, что радиационно-индуцированное старение проявляется в различных типах опухолевых клеток в зависимости от величины дозы ИИ. Таким образом, было обнаружено, что облучение клеток НМРЛ A549 в дозе 2 Гр вызывает радиационно-индуцированное старение (~ 20% SA-β-Gal+ клеток), в то время как доза 10 Гр вызывает радиационно-индуцированное старение в более выраженной степени (80% SA-β-Gal+ клеток). Однако, радиационно-индуцированное старение также зависит от типа опухоли, например, облучение клеток НМРЛ H460 в тех же дозах (2 - 10 Гр) приводит к более высокой степени радиационно-индуцированного старения по сравнению с клетками A549 [248]. Кроме того, было подтверждено, что радиационно-индуцированное старение возникает в других клетках (*p53wt*), включая клетки колоректального рака HCT116, клетки ГБМ A172 и нейробластомы SKNSH [249]. Показано, что некоторые линии клеток карциномы легких (*p53null*) также демонстрируют высокий уровень радиационно-индуцированного старения, который, по-видимому, опосредуется p16^{INK4A} [182, 250] и miR-34a [251]. Продемонстрировано, что радиационно-индуцированное старение в клетках

НМРЛ Н460 (*p53wt*) индуцируется в более высокой степени по сравнению с клетками Н460 (*p53null*) [252]. Эти данные свидетельствуют о том, что наличие *p53* играет важную роль в индукции радиационно-индуцированного старения в опухоли в ответ на повреждения, связанные с радиацией [246, 252]. Недавно было обнаружено, что регуляция выбора между апоптозом и радиационно-индуцированным старением, может быть определяется активностью секурина, многофункционального белка, участвующего в репликации, репарации ДНК [253] и онкогенезе [254]. Было показано, что экспрессия генов *CCL2*, *GRO1*, *IL6*, *IL8*, *IL1 α* и *IL1 β* значительно увеличивается в облученных клетках ГБМ [35]. Более того, было подтверждено, что облучение индуцирует экспрессию мРНК *SASP* секреторного фенотипа и транскрипционную активность *NF κ B* в клетках ГБМ [35], и, таким образом, приводит к пролиферации, инвазии, ангиогенезу и воспалению этих клеток [35]. Следует отметить, что радиационно-индуцированное старение, может способствовать прогрессированию и инвазии опухолей в условиях *in vivo* и *in vitro* [35]. Было обнаружено, что ИИ приводит к старению клеток ГБМ *in vitro*, а облученные клетки ГБМ способствуют прогрессированию необлученных клеток ГБМ при опухолевом ксенотрансплантата *in vivo* [35]. Апоптоз и старение в клетках ГБМ определяются *PTEN*. Так, дефицит *PTEN* способствует радиационно-индуцированному старению в клетках ГБМ, в то время как *PTEN^{wt}* направляет клетки ГБМ на путь апоптоза [255]. До сих пор неизвестно, могут ли стареющие опухолевые клетки способствовать индукции старения в нормальных клетках, например, через *SASP* [197].

1.9 Роль полиплоидных/многоядерных гигантских опухолевых клеток (ПГОК/МГОК) в метастазировании и рецидиве после противоопухолевого лечения

Существует большое количество доказательств того, что ответом, вызванным терапевтическими дозами противоопухолевых агентов, может являться длительная остановка пролиферации (состояние покоя), а не апоптоз [256, 257]. Эта остановка пролиферации часто сопровождается заметным увеличением размера клеток, что может отражать SIPS и/или развитие полиплоидных «гигантских» клеток либо с сильно увеличенным ядром, либо с множественными ядрами [258], с увеличенным геномным содержанием по сравнению с другими опухолевыми клетками в той же опухоли [259]. С этой точки зрения крупные опухолевые ядерные клетки или многоядерные гигантские опухолевые клетки (МГОК), обозначаемые как полиплоидные гигантские опухолевые клетки (ПГОК), вносят значительный вклад в формирование и состав опухолевых геномов и эволюцию опухоли, что делает их важными терапевтическими мишенями для борьбы с резистентностью многих видов опухолей к терапии [260]. За последнее десятилетие накоплено достаточно данных о том, что ПГОК/МГОК вносят вклад в гетерогенность солидных опухолей [261]. Длительное время ПГОК/МГОК рассматривались как терминально дифференцированные стареющие клетки, которые утратили способность к делению и элиминируются из популяции в результате действия одного из механизмов клеточной гибели [262]. В соответствии с характеристикой, предложенной Zhang с соавт. [261], к ПГОК/МГОК относят опухолевые клетки с ядрами, по меньшей мере, в 3 раза превышающими размер ядер диплоидных клеток [14, 263-265]. Поскольку ПГОК/МГОК присутствуют почти во всех опухолях человека, их образование может представлять эволюционно консервативный древний механизм адаптации,

который позволяет опухоли, включая НМРЛ, переносить суровые условия лечения [261, 266, 267]. Подсчёт ПГОК/МГОК на парафиновых срезах образцов опухоли, окрашенных гематоксилин-эозином, позволил установить, что при раке яичников, раке молочной железы и глиомах число ПГОК/МГОК коррелирует со степенью злокачественности опухолевого процесса [14, 263-265]. ПГОК/МГОК являются одним из потенциальных источников стволовых клеток [261]. Убедительные доказательства, представленные в последнее десятилетие, продемонстрировали, что выжившие ПГОК/МГОК могут способствовать развитию рецидива опухоли после противоопухолевого лечения со свойствами, подобными ОСК, сначала войдя в состояние покоя, а потом дав потомство [266, 268-271]. ОСК часто намного меньше, чем основная масса клеток, тогда как ПГОК/МГОК больше, чем основная масса клеток из-за их повышенной ploидности ($> 4n$) [258]. Основные механизмы, ответственные за образование ПГОК/МГОК, связаны со слиянием клеток [272], эндоредупликацией [273, 274], нарушением цитокинеза [273, 274] и клеточным каннибализмом путем энтоза [275]. Все эти процессы в конечном итоге способствуют образованию ПГОК/МГОК с повышенным содержанием генома по сравнению с другими опухолевыми клетками в той же опухоли [259]. Однако эндоредупликация является более распространенным механизмом образования ПГОК/МГОК [276] (Рис.1.4). Тем не менее, было обнаружено, что ПГОК/МГОК в клеточных линиях MDA-MB-231 и SKOv3, сформированные за счет слияния, составляли лишь около 10 - 20% от общего числа ПГОК/МГОК, присутствующих в этих клеточных культурах [261].

В отличие от клеточного слияния, которое может привести к образованию двуядерной клетки, эндоредупликация обычно приводит к образованию одного большого ядра, содержащего несколько копий генома [277]. В отличие от обхода митоза, приводящего к одному большому сферическому ядру,

митотическая недостаточность после стадии метафазы может привести к одному дольчатому ядру. При эндоредупликации клетки обходят инициацию механизмов регуляции клеточного цикла из-за изменений в митотическом цикле или цитокинезе [278].

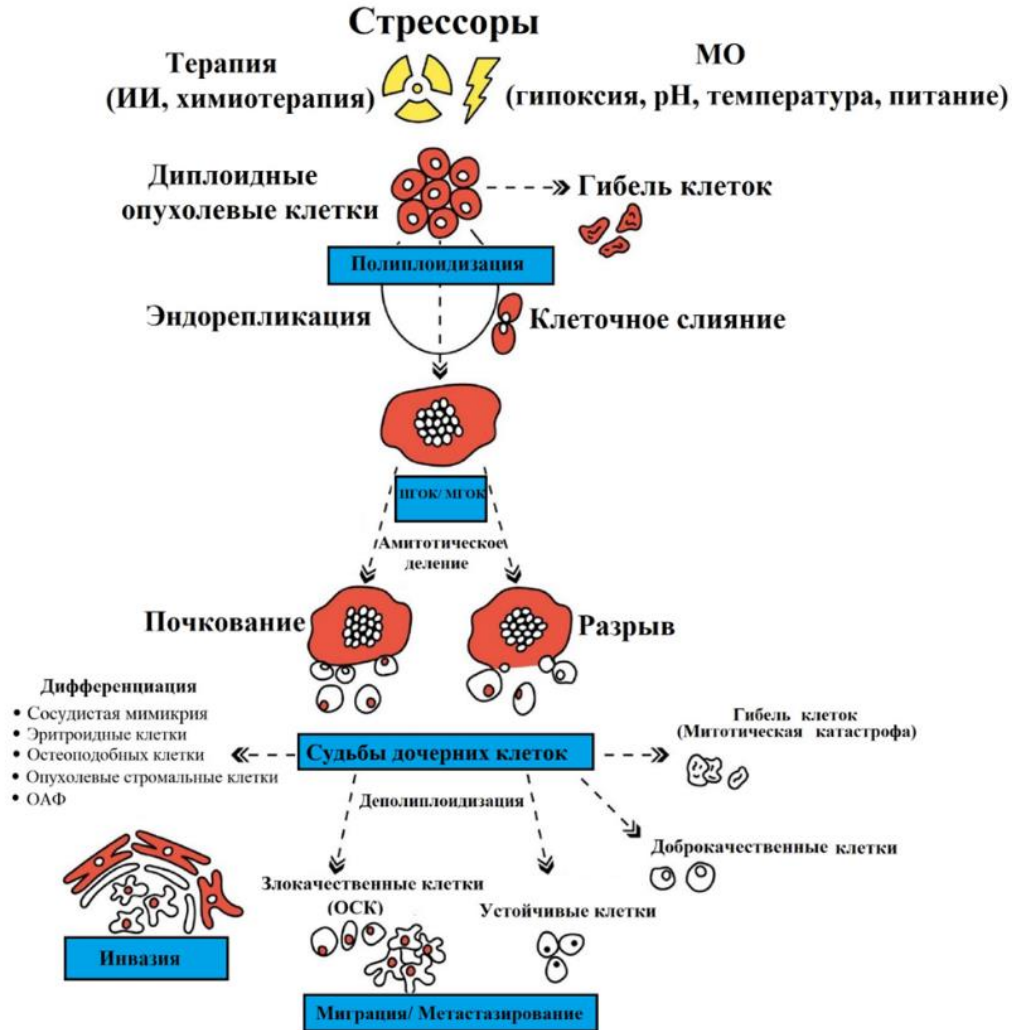


Рисунок 1.4. Схематическое представление генерации и судьбы ПГОК/МГОК и их потомства (адаптировано из Niu с соавт. и Chen с соавт.) [278, 283].

Несмотря на сообщение об образовании ПГОК/МГОК путём клеточного слияния в клеточных линиях лимфомы Ходжкина [279] и ГБМ [280], слияние

клеток в MDA-MB-231 и клеточных линиях рака яичников составляет лишь 10 – 20 % [261]. Современные исследования, показали, что после длительного периода покоя некоторые из ПГОК/МГОК приобретают способность делиться и генерировать появление дочерних клеток [281, 282]. Согласно Niu с соавт. [283], ПГОК/МГОК демонстрируют самообновление посредством эндоредупликации и далее подвергаются деполиплоидизации или асимметричному ядерному почкованию, давая начало маленьким дочерним ядрам; эти ядра затем приобретают цитоплазму, отщепляются от гигантских родительских клеток и демонстрируют длительную пролиферацию [284, 285]. Впервые было сообщено о деполиплоидизации ПГОК/МГОК Erenpreisa с соавт. [286] и Illidge с соавт. [282] в 2000 г. Помимо этого, сообщалось также о взрывоподобном делении в некоторых опухолевых клеточных линиях [261]. Niu с соавт. определили этот процесс как цикл гигантских клеток (giant cell cycle) [258], включающий четыре фазы [259, 287]:

1- фаза инициации диплоидные опухолевые клетки вступают в цикл полиплоидии в ответ на стрессоры, минуя контрольные точки клеток и избегая апоптоза [276]. Эта фаза начинается с массовой гибели клеток, вызванной существенным генотоксическим повреждением с последующей активацией программы старения, играющей критическую роль на этой фазе. Стареющие клетки увеличиваются в размерах и теряют способность деления [288, 289],

2- Фаза самообновления эта фаза возникает, когда выжившие клетки превращаются в ПГОК/МГОК за счёт избегания старения, тогда как оставшиеся диплоидные клетки поддаются стресс-индуцированному апоптозу [276]. В фазе самообновления субпопуляция опухолевых клеток входит в состояние эндоредупликации для образования ПГОК/МГОК. Таким образом, клетки, избегающие старения, вступают в S-фазу и накапливаются в фазе G2

[287]. Известно, что эндоредупликация зависит от нарушения контрольных точек клеточного цикла, обеспечиваемого CDK [276].

3- Фаза терминации начинается, когда ядра ПГОК/МГОК подвергаются деполитиплоидизации с образованием дочерних клеток с диплоидным, тетраплоидным, анеуплоидным, полиплоидным или другим хаотическим кариотипом [287]. Хромосомы неравномерно распределяются в дочерних клетках, что приводит к высокому уровню хромосомной нестабильности и иному сочетанию хромосом, чем в исходных родительских клетках [290]. Странный способ редукционного деления ПГОК/МГОК, имеющий некоторые черты сходства с мейозом, называется «неозисом» [281]. Новообразованные мелкие мононуклеарные дочерние клетки, инициирующие опухоль [281], называемые «клетками Раджу или РЖ», временно проявляют свойства, подобные стволовым клеткам, прежде чем подвергнуться клеточному делению или апоптозу [284].

4- Фаза стабилизации характеризуется появлением стабильной новой устойчивой популяции диплоидных дочерних клеток, способных в дальнейшем делиться путем биполярного, триполярного или мультиполярного митоза, давая следующему поколению диплоидных опухолевых клеток, которые подпитывают рост опухоли и обеспечивают ее выживание [283, 291].

Этот цикл регулируется ключевыми медиаторами мейоза (например, MOS), митоза (например, киназа Aurora B [292]) и самообновления (например, Oct4) [284, 285]. Было показано, что деполитиплоидизация, почкование или разрыв ядер могут начаться в любое время после противоопухолевого лечения (атаки стрессорного агента), но это может занять несколько недель (если не месяцев) пока не появится стабильная, устойчивая, быстро увеличивающаяся

популяция диплоидных дочерних клеток, которые в дальнейшем могут делиться путем митоза [257, 261, 271].

В опухолях с дефицитом *p53* хроническая сверхэкспрессия *p21* может привести к беспрепятственной репликации клеток, несмотря на накопление повреждений ДНК, что приводит к образованию ПГОК/МГОК [293]. Было продемонстрировано, что рекомбинация новых хромосом чаще происходит в РЖ клетки, образованных в ходе цикла гигантских клеток, чем в родительских клетках, что указывает на то, что РЖ клетки получают новые опухолевые геномы, которые существенно отличаются от геномов родительских клеток [268, 283]. Кроме того, спектральное кариотипирование (SKY) показало возникновение в РЖ клетках новых множественных хромосомных перестроек, включая делеции и транслокации по сравнению с родительскими опухолевыми клетками [283]. Обнаружено, что РЖ клетки, полученные из ПГОК/МГОК в клеточных линиях рака яичников Heu and SKOV3 имеют мезенхимальную форму с повышенной гетерогенностью по сравнению с регулярными опухолевыми клетками, имеющие преимущественно эпителиальную клеточную морфологию [291]. Иммуногистохимический анализ выявил, что очищенные ПОГК/МОГК из опухоли яичников человека, имеют четкий высокий уровень экспрессии белков циклина В, циклина Е, D1, CDK2 и CDK6, демонстрируя их участие в регуляции клеточного цикла [261]. Количество ПГОК/МГОК увеличивается на поздних стадиях развития онкологического заболевания [294-296]. С другой стороны, некоторые исследования показали, что именно предсуществовавшие ПГОК/МГОК в ткани опухоли ответственны за повышенную устойчивость опухоли к проводимой противоопухолевой терапии [259, 261]. Более того, доля ПГОК/МГОК как *in vitro*, так и *in vivo* заметно увеличивается в условиях ДНК-повреждающего стресса [297] и гипоксии [261, 263, 298, 299], возникающих в

МО в отсутствие экзогенного стресса после воздействия ИИ и химиотерапевтических препаратов на опухолевые клетки [182, 256, 300], в частности ГБМ [182, 256, 280, 300].

В 1956 г. было сообщено в работе Рак и Marcus, что генотоксический стресс может запускать развитие ПГОК/МГОК в клеточной линии карциномы шейки матки человека HeLa, подвергшейся ИИ [256]. Несмотря на повреждение ДНК после воздействия ИИ, некоторые клетки ПГОК/МГОК рака молочной железы 4T1, MDA-MB-231 и рака шейки матки HeLa обладают способностью пролиферации и вносят вклад в прогрессирование и репопуляцию опухоли за счет неозиса [281]. ПГОК/МГОК наблюдаются при серозной цистаденоме, серозной карциноме яичников высокой степени злокачественности, и метастатической серозной карциноме яичников высокой степени злокачественности [258].

РЖ клетки, индуцированные ИИ, обладают высокой пролиферативной способностью и низким уровнем апоптоза [259]. Было сообщено о неозисе в нескольких клеточных линиях рака предстательной железы [301], молочной железы [298] и яичников человека. Установлено, что образование ПГОК/МГОК связывается с активацией старения, тогда как почкование дочерних клеток связывается с избеганием старения [291]. РЖ клетки являются плюрипотентными со способностью к дифференцировке в эпителиальные опухолевые клетки, различные типы доброкачественных клеток [261] или могут давать начало карциномам различной степени злокачественности. В нескольких работах обнаружено образование ПГОК/МГОК в результате облучения, хотя эти клетки в конечном итоге погибали посредством митотической катастрофы [277, 302]. Zhang с соавт. наблюдали, что ПГОК/МГОК в клеточных линиях MDA-MB-231 и HEY имеют нейроноподобную форму, тогда как эти клетки в клеточной линии рака

яичника SK-OV-3 имеют более сферическую форму без отростков [261]. Рак и Marcus продемонстрировали, что воздействие ИИ на клетки карциномы шейки матки HeLa человека приводит к развитию ПГОК/МГОК, которые либо не растут или растут очень медленно, так что они часто оцениваются как «мёртвые» при обычном анализе образования колоний [182]. Наблюдения за образованием колоний приводят к выводу, что ПГОК/МГОК либо не пролиферируют, либо пролиферируют очень медленно [258]. Хотя ПГОК/МГОК входят в фазу покоя и, следовательно, не образуют макроскопических колоний (колонии ≥ 50 клеток) при стандартном анализе колониобразования *in vitro*, они остаются жизнеспособными и метаболически активными в «спящем» состоянии в течение длительного времени (например, три недели) из-за их способности переносить изменения pH питательной среды [258], если питательная среда регулярно меняется [182, 300, 303] и содержит факторы, стимулирующие рост [182]. Zhang с соавт. продемонстрировали, что потомки ПГОК/МГОК клеточной линии MCF-7 могут дифференцироваться в доброкачественные стромальные клетки, включая миоэпителиальные, эндотелиальные и эритроидные клетки [304]. Таким образом, клетки-потомки ПГОК/МГОК могут стать частью МО, заселяя строму опухоли [305] или внося свой вклад в сосудистую мимикрию [306]. Потомки ПГОК/МГОК также могут дифференцироваться в злокачественные клетки, которые часто более радио- и химиорезистентны и метастазируют, чем родительские клетки, из-за вновь приобретенных мутаций [261]. Из-за мезенхимального фенотипа эти клетки также могут мигрировать в различные ткани или органы с образованием новых опухолей [283, 298]. Вклад ПГОК/МГОК в рецидив опухоли после терапевтического воздействия был хорошо задокументирован для опухоли яичников [15, 263], груди [298] и толстой кишки. По данным Weihua с соавт. [296], единичная ПГОК/МГОК

может образовывать метастатическую опухоль, состоящую в основном из моноклеарных клеток [261, 296]. Так, было показано, что ПГОК/МГОК, полученные от онкобольных, способны инициировать опухоль *in vivo*. Было показано, что ПГОК/МГОК образуют сфероиды *in vitro* и генерируют опухоли у иммунодефицитных мышей [261, 291, 296, 307, 308]. Более того, было продемонстрировано, что ПГОК/МГОК обладают свойствами, подобными стволовым клеткам, поскольку они экспрессируют маркеры ОСК, такие как октамер-связывающий фактор транскрипции-4 (Oct4), NANOG, определяющую пол область Y-box 2 (SOX2), CD44 и CD133 [261, 308, 309]. Иммуногистохимическое окрашивание сфероидов, полученных из ПОГК/МГОК в клеточных линиях рака яичника HEY и молочной железы MDA-MB-231, показало, что составляющие их клетки экспрессируют маркеры стволовых клеток CD44 и CD133, OCT3/4, Nanog, SOX-2 и ABCG2 и SSEA1 [261]. В дальнейшем было показано, что культивирование ПГОК/МГОК в питательной среде, адаптированной для роста стволовых клеток или в Матригеле, приводит к образованию клеточных сфероидов [261]. Díaz-Carballo с соавт. [310] подтвердили, что ПГОК/МГОК могут способствовать стволовости окружающих клеток [258] путём генерирования РЖ клеток, экспрессирующих высокие уровни маркеров ОСК, таких как поверхностные гликопротеины CD44 и CD133 [261]. ПГОК/МГОК вносят вклад в трансформацию и RAS-опосредованную инициацию, и метастазирование опухоли [296, 311, 312]. Zhang с соавт. [296] сообщили, что ПГОК/МГОК характеризуются более агрессивным и метастатическим фенотипом, чем родительские клетки в клеточной линии рака предстательной железы человека PC-3. Кроме того, несколько исследований показали, ПГОК/МГОК и их потомки приобретают фенотип ЭМП [260, 261, 298], который коррелирует с усиленной экспрессии ключевых факторов транскрипции ЭМП [15]. Наличие

морфологических особенностей ЭМП этих клеток также наблюдаются в ксенотрансплантатах [291]. В ПГОК/МГОК и их потомки [298] наблюдается экспрессия высоких уровней мезенхимальных маркеров Виментина, фибронектина и N-кадгерина и низких уровней эпителиальных маркеров цитокератина и E-кадгерина. Более того, наблюдается сверхэкспрессия ABCG2 (АТФ-связывающая кассета суперсемейства G, член 2) в ПГОК/МГОК и их потомках [261], способствуя множественной лекарственной устойчивости [276]. Факторы роста и цитокины, секретируемые ПГОК/МГОК, в том числе VEGF и фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), способны повышать радио- и химиорезистентность опухолевых клеток [313, 314]. Кроме того, MIF [315] и VEGF [316] вовлечены в ангиогенез, необходимый для устойчивого роста опухолей [315]. Повышенная экспрессия CDK1 [228, 317] и его нижестоящего эффективного сурвивина [318] в ПГОК/МГОК связывается со способностью этих клеток повторно вступать в фазу роста и, таким образом, избегать старения, индуцированного терапией [276, 319], позволяя опухолевым клеткам пережить терапию [320, 321]. Сообщалось о стабилизации HIF1 α в ПГОК/МГОК после индукции старения, вызванного терапией в клетках MDA-MB-231 [314]. ПГОК/МГОК обладают высокой устойчивостью к кислородному голоданию [261]. При этом, в ПГОК/МГОК повышенный уровень АФК стабилизирует HIF-1 α , способствуя увеличению продукции VEGF и MIF [314]. Интересно, что АФК вовлечены в процесс избегания старения опухолевых клеток, индуцированного терапией, и в образование ПГОК/МГОК. Chen с соавт. подчеркнули, что стволовость ПГОК/МГОК, васкулогенная мимикрия, метастазирование и химиорезистентность являются результатом динамической взаимосвязи между ПГОК/МГОК и МО [278]. При исследовании большого числа линий опухолевых клеток было установлено, что факторами, способствующими

образованию ПГОК, являются гипоксия [261, 263, 265, 299], ИИ [182, 256, 280, 300], а также ряд химиопрепаратов, стандартно применяемых в терапии опухолей. К таким препаратам относят: цисплатин [257, 303], доксорубицин [322-324], паклитаксел [304], доцетаксел [325], 5-флюороурацил, иринотекан [323], фотемустин [326] и др. Способность ПГОК/МГОК справляться со стрессорами, такими как гипоксия и лекарства, может быть связана с множественными копиями каждого гена, что позволяет рекомбинировать ДНК, и также связана с вариацией эпигенетических паттернов. ПГОК/МГОК могут эпигенетически подавлять компоненты пути p53 и, таким образом, избегать апоптоза и старения. Кроме того, ПГОК/МГОК экспрессируют высокие уровни генов репарации ДНК, включая BRCA1 и p19Arf, что делает ПГОК/МГОК устойчивыми к цитотоксическим эффектам противоопухолевого лечения [297].

Было обнаружено, что ПГОК/МГОК способны выдерживать воздействие ИИ в высоких дозах. Было обнаружено образование ПГОК/МГОК и их потомства после облучения клеточных линий ГБМ человека SF268 и U87MG [280]. Более того, исследуя действие ИИ на первичные культуры ГБМ, был сделан вывод, что высокий процент появления ПГОК/МГОК коррелирует с плохим прогнозом [327]. Fei с соавт. установили, что в образцах ткани опухоли при колоректальном раке число ПГОК/МГОК после проведения радиотерапии увеличивается примерно в 3 раза. Поскольку ПГОК/МГОК и их потомство обладают ярко выраженными инвазивными свойствами и высокой миграционной активностью, эти авторы предложили, что удаление опухоли, учитывающее динамику процесса, может снизить вероятность проявления этими клетками свойств, опосредующих прогресс заболевания [328]. ПГОК/МГОК были обнаружены в 85,7% образцов метастатического рака яичников и лишь в 23,1% неметастатического [263]

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культивирование клеточных линий НМРЛ

В работе использовали культуры человеческих линий клеток НМРЛ: 1) клеточная линия А549 (*p53* дикий-тип); 2) клеточная линия Н1299 (*p53*-дефицитные) (АТСС, США). Клетки А549 и Н1299 культивировали в стандартной полной среде RPMI (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, МА, США), содержащей 10%-ную FBS, 1% (2 мМ L-глутамин) и 1% антибиотики (100 ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин) (Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали в условиях стандартного CO₂-инкубатора при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

2.2 Культивирование клеточных линий ГБМ

В работе использовали культуры человеческих линий клеток ГБМ, имеющих набор классических онкогенных мутаций, в ответ на ЛТ: 1) U87 (*TAp53wt /PTENmut*); 2) LN229 (*TAp53mut /PTENwt*) и 3) U251 (*GOF p53mut /PTENmut*) (АТСС, США). Клетки U87, LN229 и U251 культивировали в среде DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), содержащей 10%-ную FBS, 1% (2 мМ L-глутамин) и 1% антибиотики (100 ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин) (Sigma-Aldrich, США). Клетки переносили в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ при 37 °С.

2.3 Облучение

Клетки НМРЛ и ГБМ облучали при комнатной температуре на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (JSC «Ruselectronics», Москва, Россия): напряжение 200 кВ, анодный ток 2 x 5 мА, алюминиевый фильтр 1,5 мм. Мощность дозы составляла 0,85 Гр/мин ± 10%. Проводили

фракционированное облучение клеток НМРЛ человека А549 (*p53* дикий-тип) и Н1299 (*p53*-дефицитные) в суммарной дозе 60 Гр с последующим культивированием выживших клеток. Суммарная доза 60 Гр в режиме увеличение фракционной дозы (Fraction Dose Escalation – FDE) была разделена на несколько доз следующим образом: 10 фракций по 2 Гр, 4 фракции по 5 Гр и 2 фракции по 10 Гр. Клетки инкубировали 3 - 4 дня перед облучением фракциями 10 Гр для клеточного восстановления. В случае режима стандартного фракционирования дозы (Standard Fractionation – SF) использовали облучение клеток А549 и Н1299 30 фракциями по 2 Гр на фракцию пять дней в неделю. Родительские клетки А549 и Н1299 поддерживали без облучения в тех же условиях. После достижения общей дозы 60 Гр, клетки культивировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% СО₂ в течение 3-х недель для восстановления (Рис. 2.1). Полученные сублинии клеток стадии экспоненциального роста были дополнительно облучены рентгеновским излучением в клинически-релевантных однократных дозах 2, 4, 5 и 6 Гр.

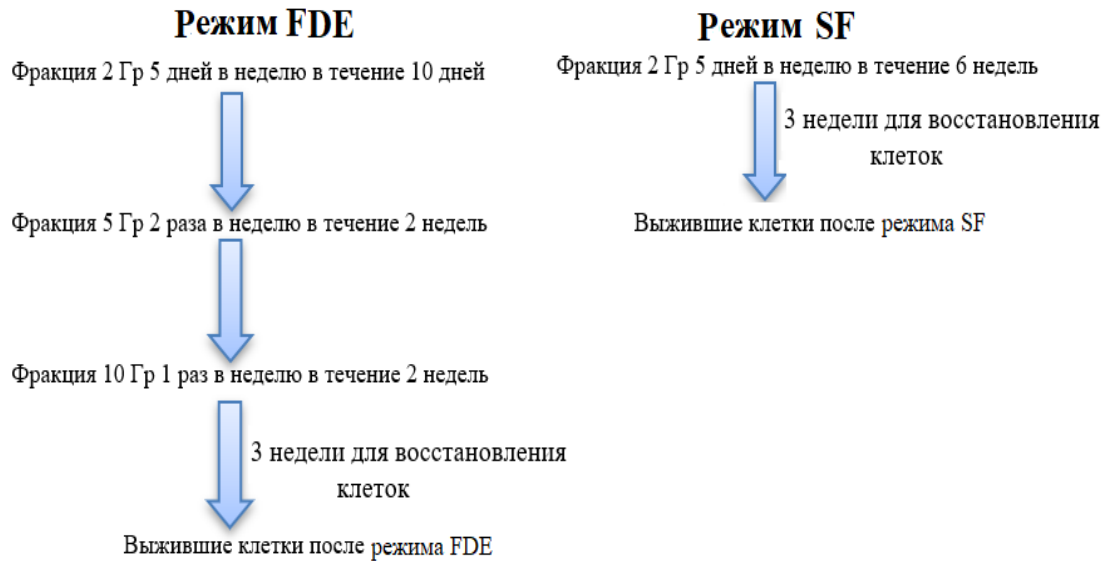


Рисунок 2.1. Схематическое изображение двух клинически значимых режимов фракционированного облучения, увеличение фракционной дозы (FDE) в разделенном курсе и стандартное фракционирование дозы (SF) экспоненциально растущих клеток A549 и H1299 в суммарной дозе 60 Гр.

Клетки U251, LN229 и U87 подвергались острому однократному воздействию рентгеновского излучения в терапевтических дозах 2, 4 и 6 Гр при комнатной температуре. Необлученные клетки использовали в качестве контроля.

2.4 Сортировка клеток

Клетки A549 и H1299 собирали путем трипсинизации, промывали в ледяном PBS (pH = 7,4). 1×10^6 клеток 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 °C. После промывки 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.

2.5 Анализ клеточной полиплоидии

Исследовали плоидность ДНК путем окрашивания культивируемых клеток НМРЛ йодистым пропидием (PI). Экспоненциально растущие клетки собирали трипсином и промывали в охлажденном до 4 °С PBS (рН 7,4) несколько раз. Суспензию клеток доводили до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл. Затем клетки фиксировали в ледяном 70% этаноле в течение 30 минут на льду и хранили при -20 °С до проведения анализа. Перед проведением анализа, образцы центрифугировали 5 минут при 300 g для декантирования этанола и дважды промывали 1x PBS (рН 7,4). Затем клетки инкубировали в растворе PI (0,5 мг/мл) и РНКазы А (100 мкг / мл) в течение 30 минут в темноте для окрашивания ДНК и удаления РНК. Проточно-цитометрический анализ выполняли на BD FAOSCKalibur (Becton Dickinson, San Jose, Сан-Хосе, Калифорния, США). Было проанализировано не менее 50000 событий/образец, и процент полиплоидных клеток был рассчитан с помощью программного обеспечения BD CellQuest Pro 5.1 (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США).

2.6 Клоногенный тест

Клетки высаживались в культуральные вентилируемые флаконы с площадью дна 25 см² (Corning, США). После достижения конfluence (70% – 80%) клетки подвергались воздействию рентгеновского излучения. Сразу после облучения, клетки собирали с помощью 0,05% раствора трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Москва, Россия) и высевали на чашки Петри диаметром 60 мм с плотностью 15 x 10, 5 x 10², 10 x 10³ и 2 x 10³ клеток/чашку, соответственно. Затем, чашки Петри инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в течение двух недель для образования колоний. После этого культуральную среду удаляли путем аспирации из каждой чашки, затем их 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:

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

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

2.7 Анализ независимого от адгезии на пластик роста клеток в мягком агаре

Использовали анализ независимого от прикрепления роста клеток в мягком агаре, описанный ранее [329]. Сразу после облучения клеток,

культивируемых в вентилируемых флаконах с площадью дна 25 см² (Corning, США), клетки собирали трипсинизацией с помощью 0,05% раствора трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Москва, Россия), затем смешивали с 0,6% агар-агаром. Смеси клетки /агар добавляли в 6-луночные планшеты (Eppendorf, Гамбург, Германия), предварительно покрытые 1,0% агар-агаром в ростовой среде (1,5 мл агара/9.5 см²), и оставляли до полного застывания агара при комнатной температуре в течение 30 минут перед помещением в инкубатор при 37 °С. 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 число колоний, содержащих ≥ 50 клеток, используя световой микроскоп.

2.8 Анализ пролиферации клеток с помощью EdU

Для оценки пролиферации клеток использовали набор Click-iT™ EdU Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Клетки культивировали в концентрациях $1,5 \times 10^3$ и 2×10^3 клеток/0,32 см² в 96-луночном планшете (Sigma-Aldrich, TPP Zellkultur. Testplatte, Тразединген, Швейцария) в течение 3 суток. К клеточным культурам добавляли 10 мМ сток-раствор EdU, разведенный в PBS в соотношении (1: 1000), и инкубировали в течение 2,5 часов во влажной атмосфере 5% CO₂ при 37° С. После этого, клетки фиксировали 2% PFA в течении 15 минут при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) в концентрации 40 мкМ, затем EdU-меченные клетки хранили в защищенном от света месте в течение ночи при + 4 °С. На следующий день, после двух промывок PBS, в каждую лунку добавляли реакционную смесь, содержащую раствор 50 мМ CuSO₄, 100 мМ Трис (pH 8,5), 10% Тритона, 1 М аскорбиновой кислоты и 1 мМ Azid Flour®

(iFluor 488) в би-дистиллированной воде, EdU-меченные клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 1 часа, а затем несколько раз промывали ФСБ. Клетки визуализировали с помощью автоматизированной микроскопической системы высокого разрешения ImageXpress Micro XL (Molecular Devices LLC, Сан-Хосе, Калифорния, США).

2.9 Иммунофлуоресцентное окрашивание Ki67 и N-кадгерина

Клетки рассевали в 384-луночный планшет (Corning, NY, США) в концентрации 2×10^3 клеток/0.056 см². Через 24 часа (ГБМ) или 24 и 48 часов (НМРЛ) после облучения клетки фиксировали с помощью 4%-го раствора параформальдегида (PFA) в PBS (pH 7,4) в течение 15 минут при комнатной температуре, с последующими двумя промывками PBS и пермеабиллизацией плазматической мембраны клеток в растворе 0,3% Triton X-100 в BSA (pH 7,4) с добавлением 2 % BSA для блокирования участков неспецифического связывания антител. Планшеты с клетками инкубировали с первичными моноклональными антителами мыши к белку N-кадгерина (5D5) (разведение 1: 2000, ab98952, Abcam, Кембридж, Массачусетс, США) и к белку Ki67 (разведение 0,005 мг/мл, clone KiS5, Merck-Millipore, Бурлингтон, Вермонт, США), разведенными в PBS с 1% BSA и 0,3% Triton-X 100. После инкубации с первичными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре, клетки промывали PBS и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с разведенными в FBS-BSA соответствующими вторичными антителами козы F(ab ')₂ к мышинным IgG (H + L) конъюгированными с флуорохромами Qdot 655 (разведение 1:50, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, МА, США) и Alexa Fluor 488 (разведение 1:500, Merck-Millipore, Берлингтон, Вермонт, США), соответственно. Затем клетки несколько раз промывали 1x PBS (pH 7,4). Ядра клеток окрашивали с помощью флуоресцентного красителя Hoechst

33342 (разведение 6 мкг/мл, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) при 4 °С в течение ночи. Клетки анализировали с использованием системы скрининга высокого содержания ImageXpress Micro XL (Molecular Devices LLC, Сан-Хосе, Калифорния, США). Интегральную интенсивность N-кадгерина рассчитывали с использованием модульного программного обеспечения для анализа изображений Cell Profiler 4.0.7 (Broad Institute, Кембридж, Массачусетс, США).

2.10 Активность оксидоредуктаз клеток (MTT тест)

Клетки культивировали в концентрации 2×10^3 клеток/0,32 см² в 96-луночных планшетах (Sigma-Aldrich, TPP Zellkultur. Testplatte, Тразадинген, Швейцария). Внесли в каждую лунку по 20 мкл рабочего раствора МТТ (конечная концентрация 0,5 мг/мл) через 24, 48, 72 часа после облучения. Затем клетки инкубировали в течение 2 часов в стандартных условиях СО₂-инкубатора при температуре 37 °С, после чего заменяли в каждой лунке рабочий раствор МТТ (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) на 150 мкл раствора DMSO (ThermoFisher scientific, Лафборо, Соединенное Королевство) для растворения образованных кристаллов формазана, образовавшихся в результате реакции. 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). Вычитали фон - оптическую плотность DMSO без клеток из результатов МТТ анализа для корректирования оптической плотности. Изменение активности оксидоредуктаз клеток регистрировали по снижению оптической плотности.

2.11 Анализ миграционной активности с помощью клеточной модели заживление «раны» (*wound healing model* или «скретч-тест»)

Клетки рассаживали в 96-луночный планшет (Sigma-Aldrich, TPR Zellkultur. Testplatte, Тразадинген, Швейцария) при плотности 2×10^4 клеток /0,32 см² до достижения (90% слияние) конфлюентности, после чего наносили царапину в середине монослоя с помощью стерильного наконечника микропипетки для имитации раневого пространства. Затем отмывали неприкреплённые клетки 3 раза раствором 1x PBS (pH = 7,4) и инкубировали клетки в полной культуральной среде до зарастания царапин на монослое при содержании в воздухе 5% CO₂ и температуре 37 °C. Визуализировали изображения начальных царапин в нулевой момент времени ($t = 0$ ч) и через различные промежутки времени 24, 48 и 72 или 96 часов ($t = \Delta$ ч), чтобы наблюдать миграцию клеток в области раны-царапины. Миграционная активность клеток оценивали с использованием системы скрининга ImageXpress Micro XL High-Content (Molecular Devices LLC, Сан-Хосе, Калифорния, США). Скорость миграции измеряли с помощью программного обеспечения MetaXpress 5.0. Миграционная активность клеток была представлена как % от исходной площади раны по следующей формуле:

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

где $A_{t=0 \text{ h}}$ - изначальная площадь раны (мкм²) сразу после царапины ($t = 0$ h), а $A_{t=\Delta \text{ h}}$ площадь раны (мкм²), измеренная через 24, 48, 72 или 96 часов после нанесения царапины.

2.12 Вестерн-блоттинг

Лизаты клеточных культур получали с использованием буфера RIPA (буфер для анализа радиоиммуно-преципитации) (150 мМ хлорида натрия,

1,0% Triton X-100, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% SDS, 50 мМ Tris-HCl и pH 8,0) и центрифугировали при 14000 g при 4 °C в течение 25 минут. Концентрацию белков определяли с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific™, Рокфорд, Иллинойс, США). 30 мкг лизатов смешивали с буфером 4X SDS и денатурировали нагреванием при 95 °C в течение 5 минут. Белки загружали в 8 - 16% SDS-полиакриламидный гель (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США) и проводили геле-электрофорез в электрофоретическом буфере (192 мМ глицин, 25 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 1% SDS (об./Об.)). Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны мини-размера (7,1 × 8,5 см, Bio-Rad Laboratories, Нойберг, Германия) с использованием стеков мини-размера (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Калифорния, США) и однократного буфера для переноса (Bio-Rad Laboratories, Hercules, США). Мембраны оставляли с блокирующим буфером Pierce™ без белка (PBS) (Thermo Scientific™, Waltham, MA, США) при 4 °C в течение ночи. После блокирования нитроцеллюлозные мембраны инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами против Виментина (1 мкг/мл, ab45939, Абсам, Кембридж, Массачусетс, США), Е-кадгерина (клон EP700Y, разведение 1: 1000, ab40772, Абсам, Кембридж, Массачусетс, США), p63 (разведение 1: 1000, ab124762, Абсам, Кембридж, Массачусетс, США) и p73 (разведение 1: 2000, ab40658, Абсам, Кембридж, Массачусетс, США) при 4 °C на ночь. После отмывки раствором TPBS (1× PBS, содержащий 0,05% Твин-20) 3 раза по 3 минут, мембраны инкубировали с овечьими антителами против p-SAR IgG кролика (разведение 1: 5000, ИМТЕС, Москва, Россия) и овечьими антимышиными p-SAM IgG (разведение 1: 1000, ООО «ИМТЕК», Москва, Россия) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем мембраны промывали раствором TPBS 5 - 8 раз по 5 минут. Реагент Clarity™ Western ECL Substrate раствор

люминола/пероксида (разведение 1:1, Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) добавляли для хемилюминесцентного обнаружения белков. Окрашивание белка Ронсеау S (0,1% Ронсеау S и 5% уксусная кислота) выполняли для нормализации. Изображения были получены и проанализированы с помощью системы визуализации ChemiDoc™ MP (170 – 8280) компании Bio-Rad (Геркулес, Калифорния, США).

2.13 Анализ экспрессии фактора транскрипции FRA1

Клетки НМРЛ собирали трипсином и промывали в охлажденном до 4 °C PBS несколько раз. Количество клеток доводили до концентрации 1×10^6 клеток/мл. После этого клетки фиксировали в 4% растворе параформальдеда в течение 15 минут и пермеабелизировали их раствором 0,3% Triton-X 100 в течение 5 минут. Затем блокировали образцы раствором 2% BSA в PBS в течение 40 минут. Клетки инкубировали с моноклональными кроличьими антителами к FRA1, конъюгированными с Alexa Fluor® 488 (разведение 1: 500, клон EP4711, Abscam, Кембридж, Массачусетс, США) в течение 1 часа. После трехкратной промывки PBS (pH 7,4), содержащим 0,1% BSA, клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD FACSCalibur (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США). Было проанализировано не менее 50 000 событий/образец. Медианную интенсивность флуоресценции рассчитывали с помощью программного обеспечения BD Cell Quest Pro 5.1 (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США).

2.14 Анализ доли МГОК в клеточных популяциях

Клетки культивировали в 96-луночном планшете (Sigma-Aldrich, TTP Zellkultur. Testplatte, Тразединген, Швейцария) при концентрации 100×10^3 клеток/ $0,32 \text{ см}^2$. Через 24 часа после облучения клетки фиксировали в

абсолютном метаноле в течение 5 минут, после чего клетки окрашивали разбавленным раствором Райта-Гимзы в 1х PBS (pH 6,6) в отношении 1:10 в течение 1 часа с последующим промыванием 1х PBS (pH 6,6) и дистиллированной водой. Лунки высушивали на открытом воздухе, после чего подсчёт среднего числа МГОК производили в пяти микроскопических полях зрения с увеличением $\times 100$. Мы использовали многопараметрический количественный анализ высокого разрешения для определения площади ядра ($\mu\text{км}^2$) МГОК для каждой из линий.

2.15 Анализ метаболизма клеток в составе колоний - AlamarBlue-тест в мягком агаре

Заливали приготовленную смесь 0,3% агар-агара в ростовой среде в каждую лунку 96-луночного планшета (Sigma-Aldrich, TPP Zellkultur. Testplatte, Тразадинген, Швейцария) 100 мкл агара/ $0,32 \text{ см}^2$ и затем давали возможность затвердеть при комнатной температуре в течение 30 минут. Сразу после облучения, клеточные суспензии осторожно перемешивали с 0,2% агар-агаром, предварительно нагретым до $43 \text{ }^\circ\text{C}$. Культивировали клетки при концентрации 6×10^2 клеток/100 мкл. Сразу после затвердевания добавляли в каждую лунку в качестве питающего слоя 50 мкл 0,3% агар-агара в ростовой среде и давали затвердеть в течение 30 минут при комнатной температуре. Клетки инкубировали в стандартных условиях CO_2 -инкубатора (5% CO_2 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$) в течение 7 дней, после этого в каждую лунку добавляли 10 % реагента Alamar Blue (Invitrogen, Фредерик, Мэриленд) и инкубировали клетки в течение 2 часов при 5% CO_2 и $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Для нормализации, заливали смеси агара с ростовой средой в одних и тех же концентрациях. Флуоресценцию 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).

2.16 Анализ ассоциированной со старением бетта-галактозидазы (β -Gal)

Детекцию активности ассоциированной со старением бетта-галактозидазы (SA- β -Gal) (маркер фенотипа клеточного старения) проводили с использованием коммерческого набора для оценки клеточного старения «Cellular Senescence Assay Kit» (EMD Millipore KAA002, США). Клетки культивировали в 96-луночной планшете (Sigma-Aldrich, TPP Zellkultur. Testplatte, Тразединген, Швейцария) в концентрации $2 \times 10^3/0,32 \text{ см}^2$. В течение 24 часов после облучения, клетки окрашивали в соответствии с протоколом производителя: из лунок отбирали ростовую среду, после этого промывали клетки 200 мкл 1x PBS. Затем добавляли по 200 мкл фиксирующего раствора в каждую лунку и инкубировали 10 - 15 минут при комнатной температуре. Дважды промывали 200 мкл 1x PBS. Добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора для определения SA- β -Gal, после этого инкубировали на ночь с защитой от света при 37 °C в отсутствии CO₂. Затем удаляли раствор SA- β -Gal и дважды промывали чашки 200 мкл 1x PBS. Присутствие фермента β -Gal в клетках определяется по характерному окрашиванию цитоплазмы в зеленый цвет. На конечном этапе клеточные ядра были окрашены 6 мкг/мл Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) для улучшения подсчета β -Gal негативных клеток. Для длительного хранения окрашенных препаратов в лунках добавляли 70% глицерол, разбавленный 1x PBS, и хранили клетки при температуре 4 - 8 °C.

2.17 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: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ***** $p < 0,00001$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Выжившие после фракционированного облучения с режимами FDE и SF клетки A549 (A549DE и A549S, соответственно) существенно не различались по адгезии от своих родительских клеток, хотя и демонстрировали более веретеновидную морфологию. Выжившие после фракционированного облучения с режимами FDE и SF клетки H1299 (H1299DE и H1299S, соответственно) изменили морфологию, приобретая более выраженный мезенхимальный фенотип (округлую или веретенообразную форму) по сравнению с родительскими клетками, демонстрирующими обычный эпителиальный фенотип (Рис. 3.1 А). 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 *p53* (результаты не представлены). 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 *p53*. Так, по сравнению с родительскими клетками, выжившие после режима FDE клетки *p53wt* A549DE были более устойчивы к

дополнительному облучению в дозах 2 и 4 Гр, тогда как клетки *p53null* H1299DE оказались более радиочувствительными (Рис. 3.1 А).

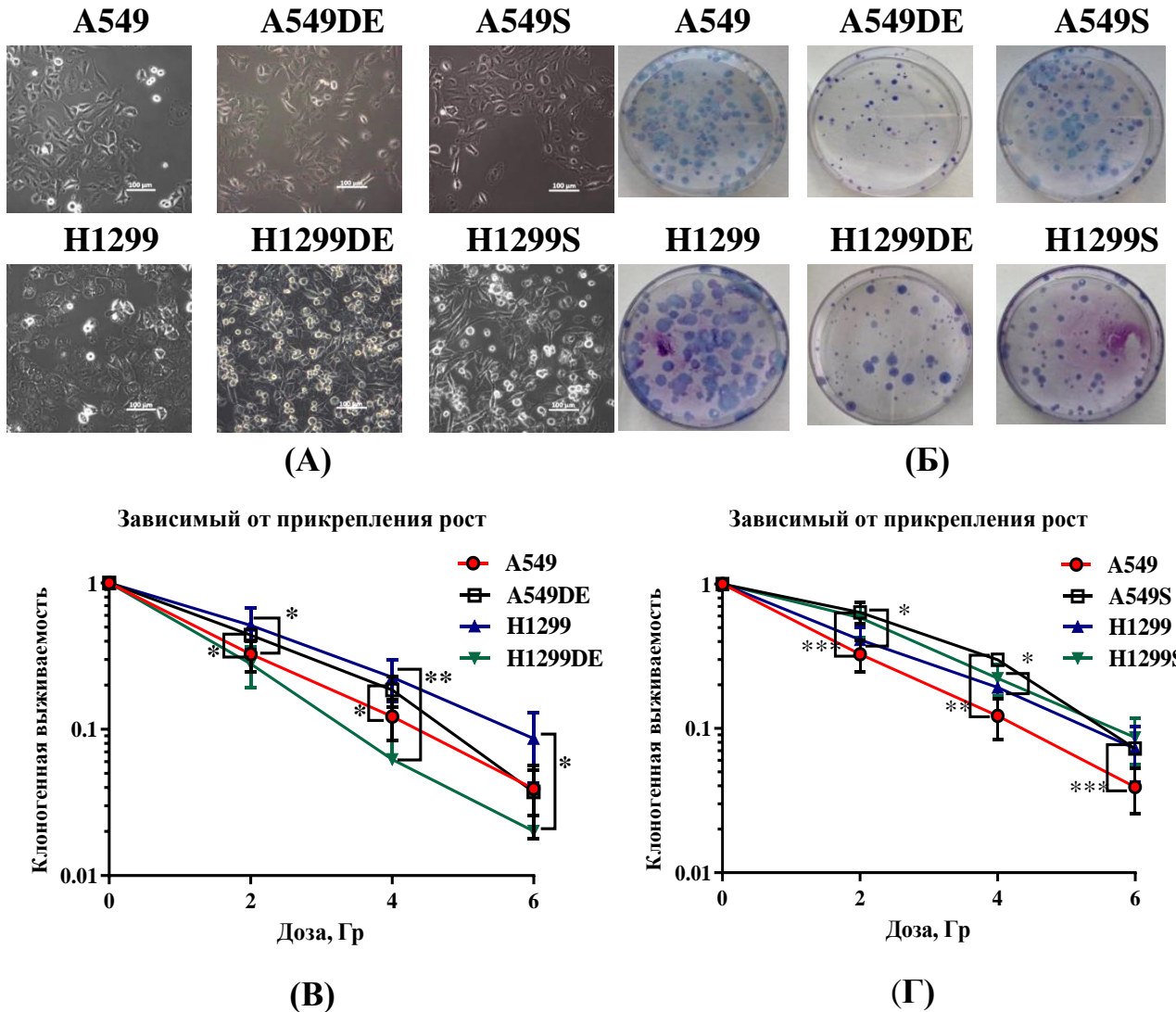


Рисунок 3.1. Микрофотографии родительских клеток и их выживших после фракционированного облучения субблиней. Масштабная линейка 100 мкм (А). Фотографии колоний выживших после фракционированного облучения клеток НМРЛ по сравнению с родительскими клетками (Б). Клоногенная выживаемость родительских клеток и клеток выживших после фракционированного облучения с режимами FDE (В) и SF (Г). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

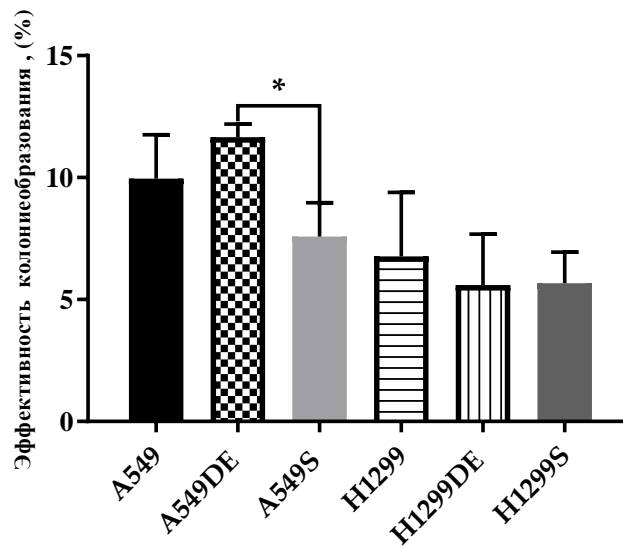
Режим SF вызывал увеличение радиорезистентности клеток *p53wt* A549S к дополнительному облучению в дозах 2, 4 и 6 Гр (Рис. 3.1 Б), тогда как *p53null* H1299S клетки были более устойчивы к дополнительному облучению в дозах 2 и 4 Гр, по сравнению с родительскими клетками. Эти результаты могут указывать на значительную связь наличия функционально-активного *p53* с радиочувствительностью опухолевых клеток независимо от режима фракционирования дозы. С другой стороны, режим фракционирования дозы может существенно модулировать радиочувствительность *p53null* НМРЛ клеток, что предполагает связь эффективности режима фракционирования и экспрессии других белков семейства *p53*.

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

Морфологические изменения клеток H1299DE и H1299S могут быть связаны со снижением ЭК этих выживших после фракционированного облучения клеток и влиять на их способность образовывать колонию на твердой поверхности. В то же время, избегание аноикиса и независимый от прикрепления рост клеток позволяют опухолевым клеткам размножаться и метастазировать [330]. Независимый от прикрепления рост клеток в мягком агаре является одним из признаков туморогенеза и наиболее точным индикатором трансформации клеток *in vitro* [331]. Количество колоний, образующихся в этом анализе, зависит от ОСК в культурах, когда клетки трансформируются [179, 332, 333].

Не зависящий от прикрепления к субстрату опухолевых клеток является отличительной чертой их резистентности к разновидности апоптоза называемой аноикисом (*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 (Рис.3.2 А).



(A)

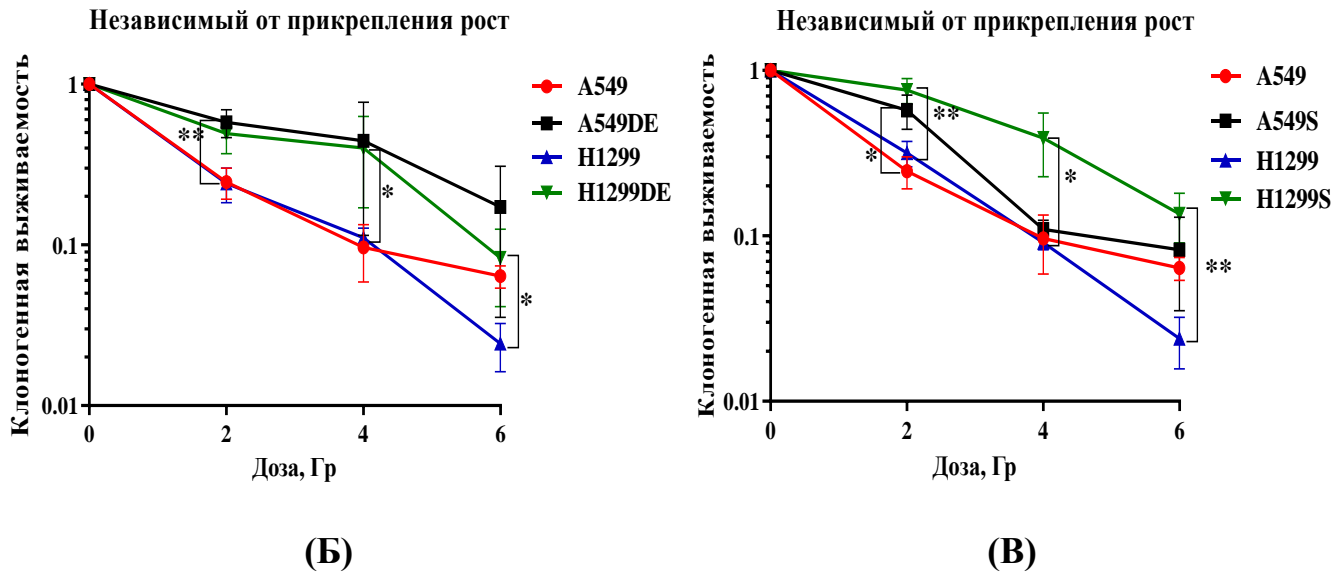


Рисунок 3.2. Эффективность колониеобразования в мягком агаре родительских и выживших после фракционированного облучения клеток НМРЛ (А). Клоногенная выживаемость родительских клеток и их сублиний, выживших после фракционированного облучения с режимами FDE (Б) и SF (В). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Облучение в режиме SF существенно не влияло на независимую от адгезии на пластик клоногенную выживаемость клеток *p53wt* A549S, за исключением статистически значимого увеличения выживаемости после тестирующего облучения в дозе 2 Гр (Рис. 3.2 В), тогда как облучение с режимом FDE приводило к повышению выживаемости клеток A549DE (Рис 3.2 В). Оба режима вызывали общую более высокую дозозависимую клоногенную выживаемость клеток *p53null* H1299DE и H1299S, указывая на увеличение их радиорезистентности по сравнению с их родительскими клетками H1299 (Рис. 3.2). Таким образом, независимо от наличия функционально-активного *p53*, 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 *p53null* клеток.

3.3 Изменение пролиферативной активности 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. 3.3 А), а после облучения в режиме FDE снижение активности оксидоредуктаз (Рис. 3.3 Б). В целом оба режима облучения вызвали в этих клетках однонаправленные изменения: снижение пролиферативной и метаболической активности. 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. 3.3 А) и активности оксидоредуктаз (Рис. 3.3 Б), тогда как облучение в режиме SF напротив увеличивало пролиферативную активность и активность оксидоредуктаз выживших клеток (Рис. 3.3 А и Б, соответственно).

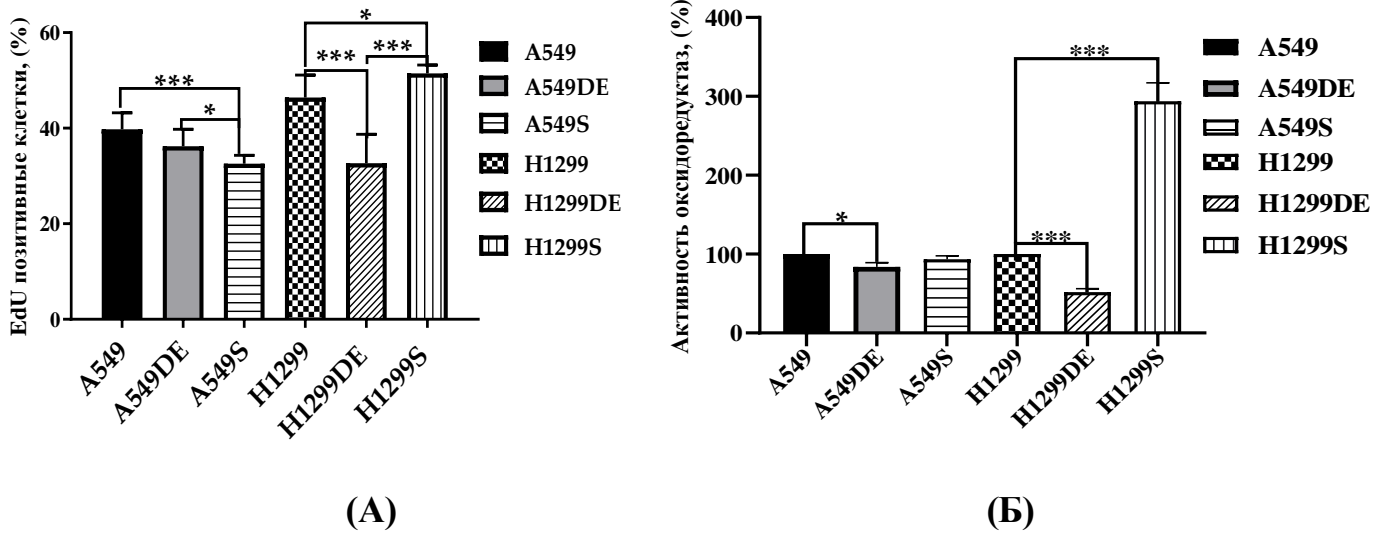


Рисунок 3.3. Оценка пролиферативной активности (А) и активности оксидоредуктаз (МТТ-тест) (Б) как в родительских (необлученных) клетках А549 и Н1299, так и в выживших клетках после FDE (А549DE и Н1299DE) и SF (А549S и Н1299S) режимов облучения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

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

ОСК-подобные (CD44+ и CD133+) по сравнению с не-ОСК (CD44-/CD133-изогенные субпопуляции клеток *p53wt* А549 и *p53null* Н1299 различаются по наличию признаков дормантности («покоя»), включая полиплоидию, которая являются ранними маркерами (предикторами) их чувствительности к генотоксическому стрессу.

Впервые мы продемонстрировали, что фракции ПГОК и/или МГОК, преимущественно характеризующиеся прогрессивно увеличивающимся фенотипом Ki67^{low} в клетках CD44+ и CD133+ А549 через 24 – 48 часов после ИИ. Напротив, обогащение Ki67^{high} фенотипом в одних и тех же фракциях всех

отсортированных клеток H1299 свидетельствует об увеличении их активности в клеточном цикле и реорганизации гетерохроматина после ИИ стресса.

Мы использовали анализ интенсивности флуоресценции, связанный с EdU, для характеристики типов клеток, отличающихся сильно различающимися характеристиками клеточного цикла. Через 24 часа культивирования каждая необлученная отсортированная клеточная ОСК-подобная популяция линий НМРЛ (A549 и H1299) состояла из двух субпопуляций (синие точки на рис. 3.4). Во-первых, предположительно медленно пролиферирующая популяция клеток (МПК), чьи значения площади ядра напрямую коррелируют с интегрированной интенсивностью EdU, ограниченными определенными фиксированными и относительно низкими уровнями. Другая популяция с рассеянным распределением высокой интегрированной интенсивности флуоресценции, связанной с EdU при разных значениях площади ядра, что, вероятно, представляет собой активно пролиферирующую популяцию клеток (АПК). Такое распределение всех субпопуляций МПК и АПК и соотношение фоновых значений максимальных интенсивностей сохранялись даже после 48 ч культивирования необлученных клеток A549 и H1299. На основании этих данных можно предположить, что необлученные МПК обеих клеточных линий, скорее всего, находятся преимущественно в фазе G1–G0 клеточного цикла, а АПК – в фазе S–G2 клеточного цикла.

Чтобы сравнить клетки, выходящие из клеточного цикла (медленные/нециклические и пролиферирующие, например, в МПК) в обеих клеточных линиях, мы оценили отношение интегрированной интенсивности EdU- и Ki67-связанных (оси X и Y соответственно на Рис. 3.4) флуоресценции, которые были одновременно измерены в ядрах тех же облученных (A549S и H1299S) и необлученных клеток (A549 и H1299). По сравнению с необлученными клетками, большинство популяций облученных линий A549 и

H1299 вышло из клеточного цикла и накопилось в предположительно покоящихся популяциях, демонстрирующих чрезвычайно низкую интенсивность флуоресценции, связанную с EdU и Ki67 (Рис. 3.4), в тех же клетках, которые имели ограниченное значение интегрированной интенсивности через 24 часа после облучения. Значительно меньшая, предположительно активная в клеточном цикле и пролиферирующая субпопуляция этих клеток демонстрировала повышенную линейно связанную интенсивность флуоресценции, большую, чем у необлученных клеток. Таким образом, количество клеток A549 с субпопуляциями МПК ($Ki67^{low}/EdU^{low}$) и АПК ($Ki67^{high}/EdU^{high}$) было значительно ниже, чем у клеток H1299. Эти данные свидетельствуют о том, что фракции клеток A549, выходящих из клеточного цикла и вновь вступающих в него, были намного меньше, чем в клетках H1299, фракция CD44⁺ которых, вероятно, чаще выходила из «спящего» состояния через 48 часов после воздействия 5 Гр.

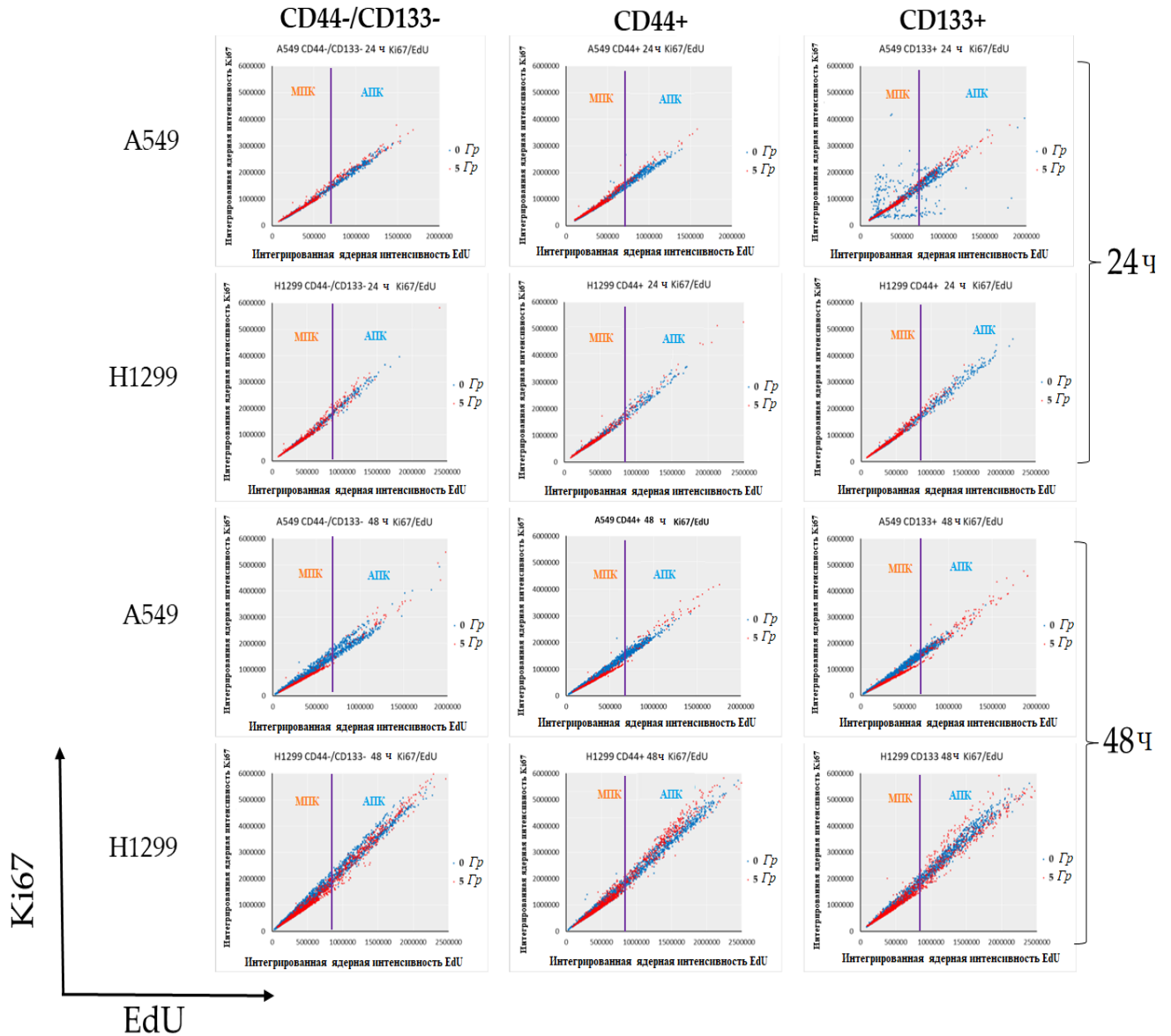
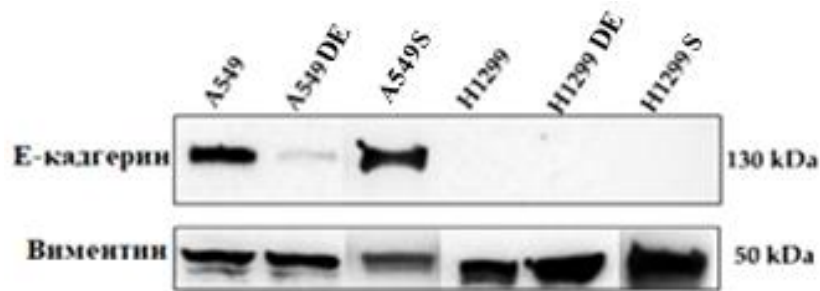


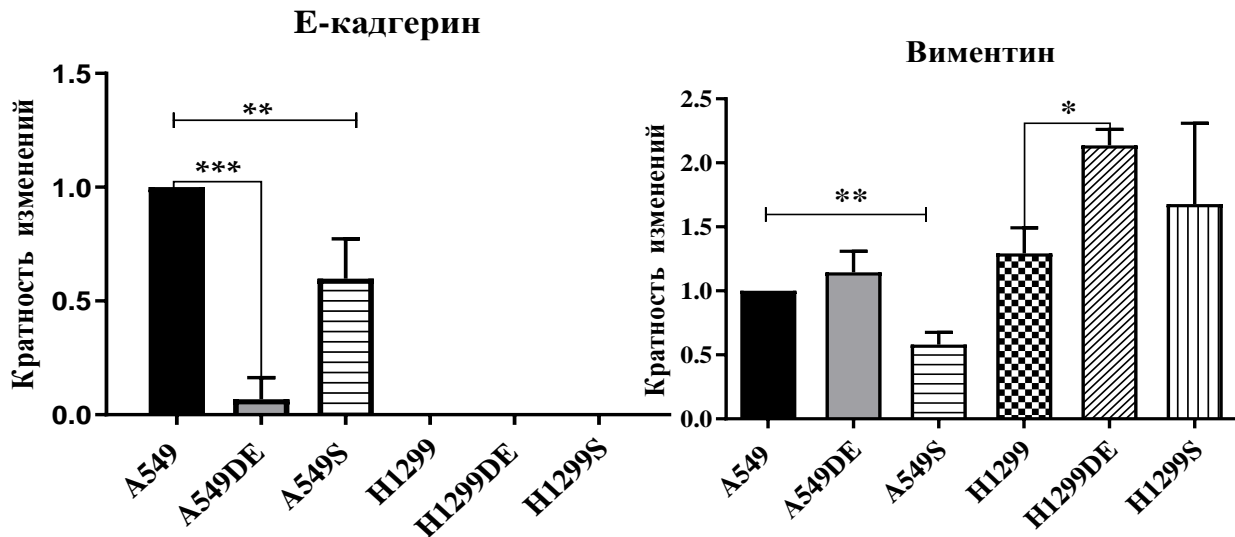
Рисунок 3.4. Флуоресценция, связанная с Click-IT EdU и Ki67, измеренная в CD44+ и CD133+ A549 и H1299. Представлен количественный флуоресцентный анализ единичных клеток EdU и Ki67 для дифференциации между группой МПК ($Ki67^{low}/EdU^{low}$) и группой АПК ($Ki67^{high}/EdU^{high}$) в каждой отсортированной клеточной популяции облученных (красные точки) и необлученных (синие точки, контроль) клеток через 24 и 48 часов культивирования после облучения при дозе 5 Гр.

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

Фракционированное облучение вызывало снижение экспрессии Е-кадгерина (маркера эпителиального фенотипа) в выживших *p53wt* А549 клетках, более выраженное после облучения в FDE режиме, (Рис. 3.5 А). Мы не смогли оценить экспрессию этого эпителиального маркера в клетках H1299, поскольку они не экспрессируют Е-кадгерин эндогенно.

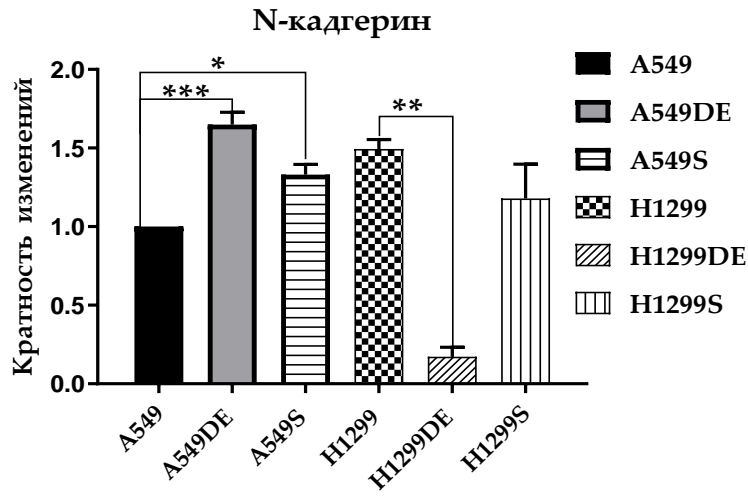


(A)

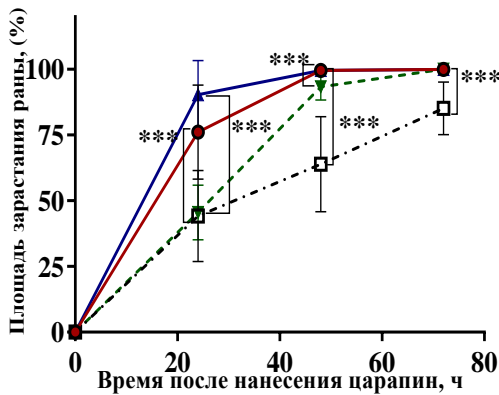


(B)

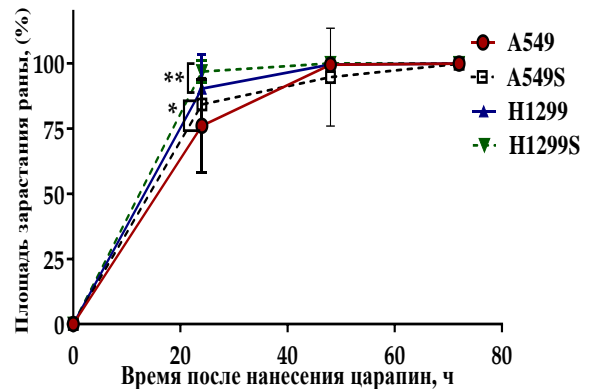
(B)



(Г)



(Д)



(Е)

Рисунок 3.5. Вестерн-блоттинг (А) и количественный анализ экспрессии маркеров, связанных с ЭМП (Б - Г) и миграционная активность клеток НМРЛ через 24, 48 и 72 часа после нанесения царапин на монослое выживших клеток («scratch» тест) после фракционированного облучения с режимами FDE (Д) и SF (Е). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Облучение в режиме FDE статистически значимо увеличивало экспрессию Виментина (мезенхимального маркера) в клетках *p53null* H1299DE, вызывая лишь незначительное увеличение его экспрессии в клетках *p53wt* A549DE (Рис. 4 Б). Интересно, что тот же режим модулировал экспрессию другого мезенхимального маркера, N-кадгерина, наоборот: увеличивал его экспрессию в клетках *p53wt* A549DE и подавлял в клетках *p53null* H1299FR (Рис. 3.5 В). Облучение в режиме SF вызвало статистически значимое снижение экспрессии Виментина в клетках *p53wt* A549S, тогда как *p53null* H1299S статистически значимых изменений не было зарегистрировано. Тот же режим приводил к статистически значимой активации N-кадгерина в клетках *p53wt* A549S и незначительному подавлению его активности в клетках *p53null* 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 клетках *p53null*, либо за счет aberrантной активации N-кадгерина в клетках *p53wt*. Режим SF, вероятно, в меньшей степени влияет на активацию ЭМП независимо от присутствия *p53* в выживших после облучения клеток НМРЛ. Режим SF не оказывал значительного влияния на «1D» горизонтальную миграцию выживших после облучения клеток, хотя и несколько снижал их миграцию через 24 часа после нанесения «царапины» (Рис. 3.5 Д). Напротив, режим FDE замедлял миграцию выживших клеток: в клетках *p53wt* A549DE до 72 часов и клетках *p53null* H1299DE до 48 часов (Рис. 3.5 Г). Эти данные показывают, что режим фракционированного облучения в большей степени чем наличие *p53* влияет на 1D ограниченное миграционное поведение выживших после облучения клеток НМРЛ.

3.6 Экспрессия FRA1 в клетках НМРЛ в присутствии и отсутствии p53

FRA1 является регулятором гена семейства AP1 и промотором многих злокачественных новообразований. FRA1 значительно способствует росту, подвижности и инвазии эпителиальных клеток легких человека [334]. Поэтому 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 выживших клеток НМРЛ. Было показано, что экспрессия FRA1 в родительских клетках *p53null* 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 *p53wt* и выживших клетках (A549DE и A549S) независимо от режима фракционирования дозы (Рис. 3.6). С другой стороны, мы не обнаружили статистически значимых различий в экспрессии FRA1 между родительскими и выжившими после облучения популяциями клеток независимо от наличия p53 и режима облучения (Рис. 3.6).

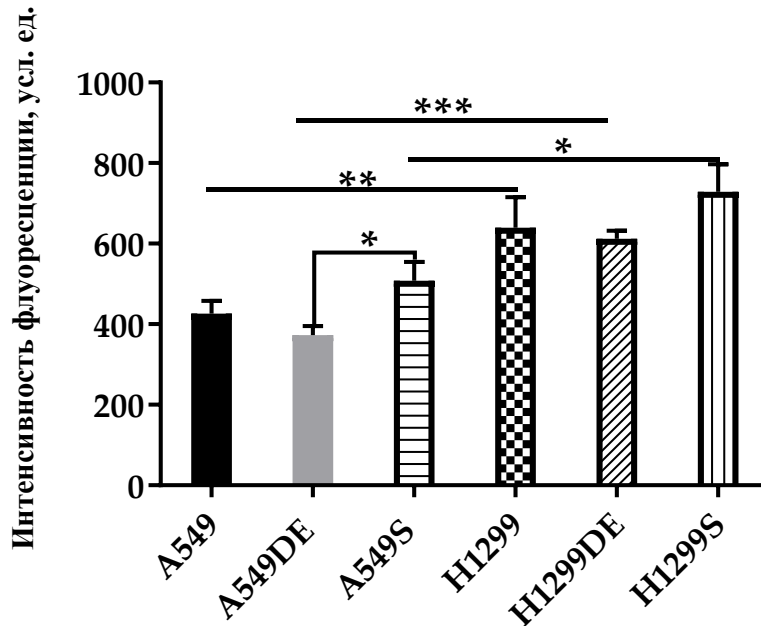


Рисунок 3.6. Экспрессия FRA1 в родительских и выживших после фракционированного облучения клетках A549 и H1299. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

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

Несмотря на установленную роль p53 в качестве супрессора опухолей, аналогичная функция p73, другого члена этого семейства, при злокачественных новообразованиях является сомнительной, предполагая, что p73 может усиливать, а не ингибировать развитие опухоли [335]. Члены семейства p53 - белки p63 и p73, проявляют функции, очень похожие на функции p53, но они по-разному активируются ИИ, UV и цисплатином через пути передачи сигналов ATM и c-abl/ATR. В изогенных системах *in vitro* потеря функции p53 или p73 была связана со снижением химио- и радиочувствительности [336].

Как и ожидалось, в отсутствие функционального *p53*, экспрессия *p63* и *p73* была повышена в родительских клетках *p53null* H1299 по сравнению с клетками *p53wt* A549 (Рис. 3.7).

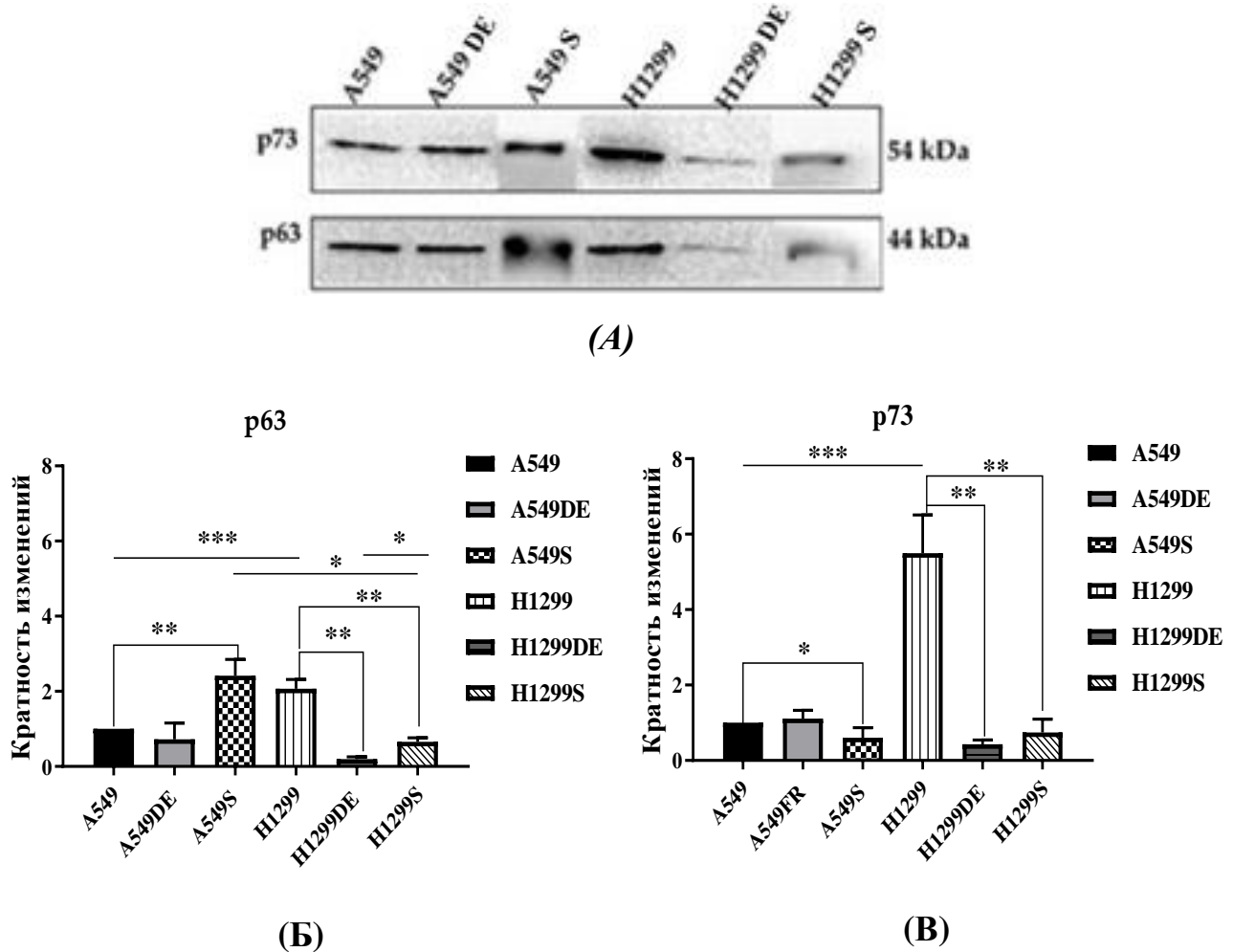


Рисунок 3.7. Количественный анализ экспрессии *p63* (А) и *p73* (Б) в родительских и выживших после фракционированного облучения клетках A549 и H1299. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Облучение в режиме FDE приводило к статистически значимому снижению уровней *p63* и *p73* в клетках *p53null* H1299DE в ~ 2 и 5 раза, соответственно. Тот же режим не изменил экспрессию этих белков в клетках *p53wt* A549DE. После облучения в режиме SF клетки *p53wt* A549S

экспрессировали больше p63 и меньше p73, тогда как экспрессия обоих белков была существенно подавлена в клетках *p53null* H1299S по сравнению с родительскими клетками (Рис. 3.7 А, Б).

3.8 Полиплоидия, индуцированная радиационным воздействием в клетках НМРЛ

Наличие ПГОК является еще одной отличительной чертой злокачественности опухолевой ткани, а полиплоидия связана с нестабильностью хромосом и прогрессированием рака. Хотя ПГОК описаны более столетия назад, в настоящее время они активно исследуются в связи с их важной ролью в онкогенезе, метастазировании, устойчивости к терапии и рецидивах опухоли после терапии [258, 337]. Чтобы оценить возможную разницу в доле ПГОК между родительскими и выжившими клетками НМРЛ после фракционированного облучения, мы проводили проточно-цитометрический анализ с использованием окрашивания ДНК йодидом пропидия (Рис. 3.8).

После облучения в режиме FDE доля ПГОК в популяциях выживших клеток *p53wt* снижается, а в популяциях выживших клеток *p53null*, напротив увеличивается. Облучение в режиме SF вызывало увеличение доли ПГОК вне зависимости от присутствия *p53*. Наши результаты указывают, что режим фракционирования влияет на образование ПГОК преимущественно в клетках *TAp53wt*, в то время как в отсутствие гена *TAp53* увеличение доли ПГОК мало зависит от режима облучения.

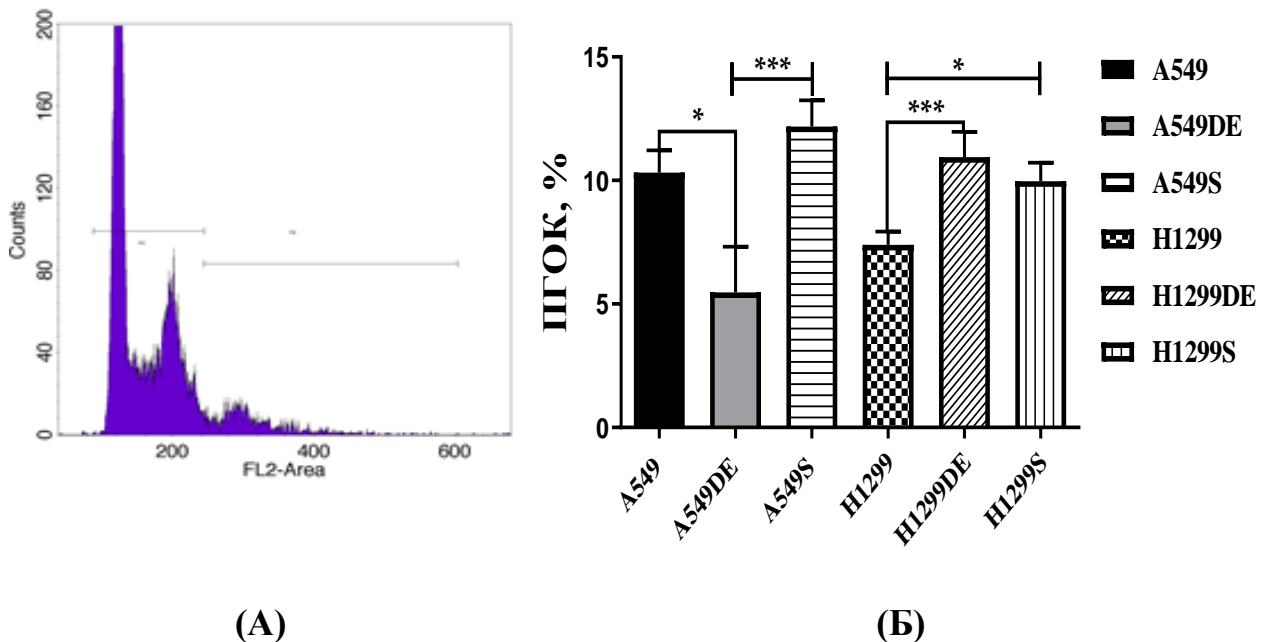


Рисунок 3.8. Анализ содержания ДНК методом проточной цитометрии (А). Доля ПГОК в родительских и выживших после фракционированного облучения клетках НМРЛ. (Б). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Обобщая, полученные нами данные позволили предположить, что значительное увеличение экспрессии p63 в опухолевых клетках, приобретение ими выраженного ЭМП фенотипа и состояния временного 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 *TAp53wt* A549S. Интересно, что в отсутствие *TAp53wt*, 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 склонностью к репопуляции, лежащими 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 МГОК в ответ на однократное облучение в терапевтически-релевантных дозах 2 - 6 Гр существенно различается для клеточных линий U87 (*TAp53wt/PTENmut*), LN229 (*TAp53mut/PTENwt*), U251 (*GOF p53mut/PTENmut*) (Рис. 3.9).

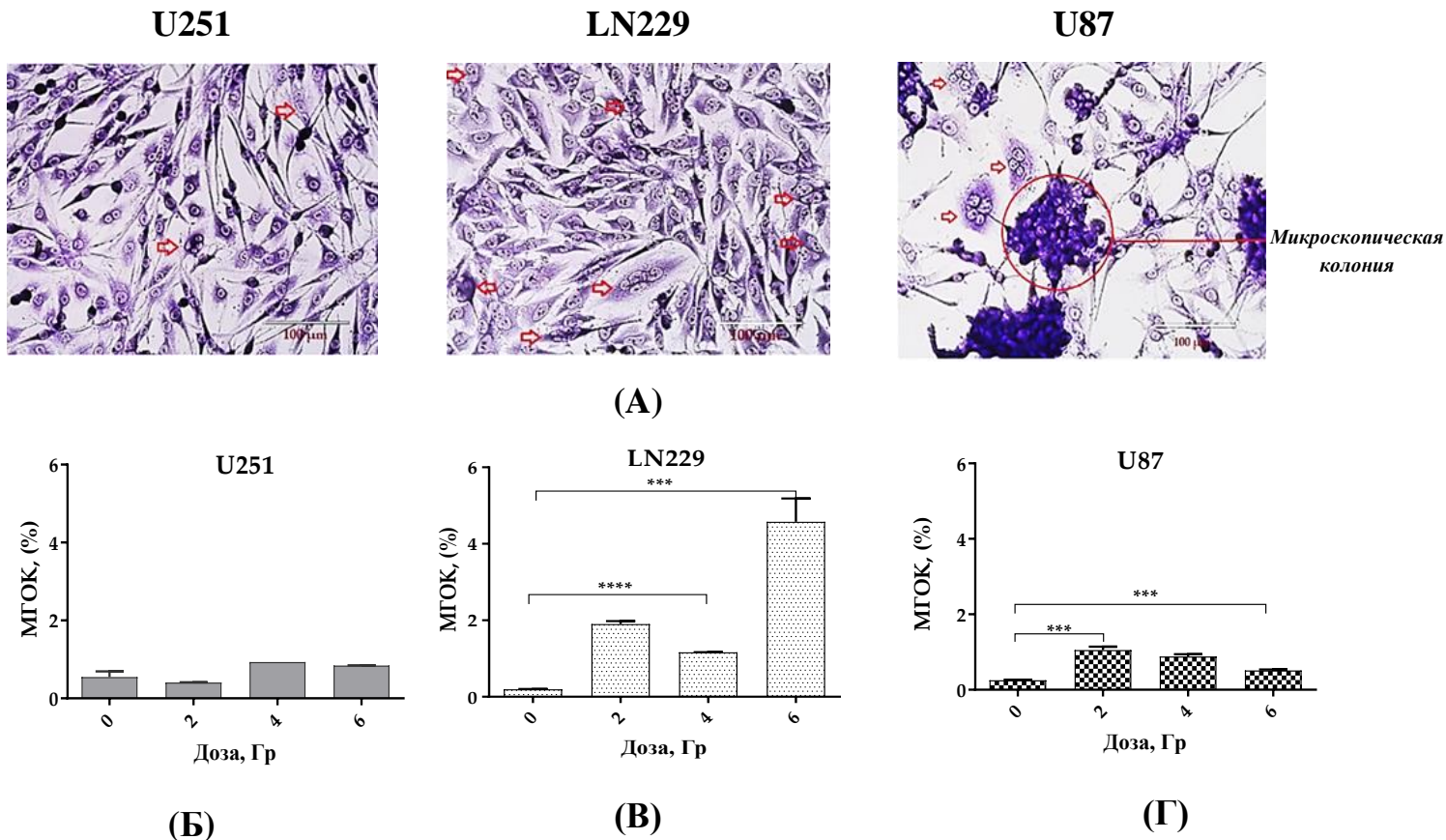


Рисунок 3.9. (А) МГОК после окраски по Гимзу-Райт на увеличении 20х. МГОК, полученные из клеток (Б) U251, (В) U251 и (Г) U87 через 24 часа после облучения в дозах 2 - 6 Гр (указано стрелками). *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

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 клетки U251 существенно не отличались от своего контроля.

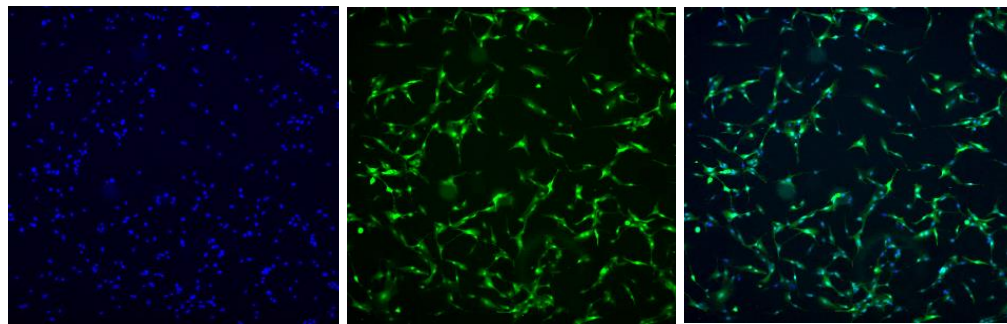
Однократное облучение приводило к статистически значимому дозозависимому увеличению доли МГОК в клетках LN229. Для клеток U87 этот эффект был менее выражен, а популяциях клеток U251 статистически значимого увеличения доли МГОК вообще не наблюдалось. Было также обнаружено, что некоторые МГОК, полученные из U87 в отличие от клеток LN229 и U251, могут генерировать многочисленные небольшие моноклеарные клетки (называемые клетками Раджу или РЖ) и в конечном итоге образовывать клеточные колонии (процесс, называемый «неозисом») через 24 часа после облучения.

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

В ответ на облучение в клетках наблюдалось существенное различие в доле ДНК-реплицирующих клеток в S фазе (тест Click-IT™ EdU) и доле Ki67+ клеток (маркер клеточной пролиферации).

В ответ на однократное облучение в дозе 6 Гр во всех исследованных клеточных линиях отмечалось статистически значимое снижение доли ДНК-реплицирующих клеток (Рис. 3.10). Однако облучение в дозе 2 Гр вызывало неоднозначный эффект: снижение пролиферативной активности в клетках линии U251 и увеличение пролиферативной активности клеток LN229 (Рис. 3.10).

Ответ на облучение в дозе 6 Гр сопровождался увеличением популяции G0 клеток, находящихся в состоянии глубокого покоя во всех клеточных линиях независимо от их *p53/PTEN* активности. Результаты высококонтентного микроскопического анализа показали, облучение приводит к образованию значимого количества ПГОК/МГОК, находящихся в состоянии покоя в клеточных линиях с *TAp53* (либо wt (U87)), (либо мутированного (LN229)), но не в клетках с *GFP53mut*, где наблюдались только единичные такие клетки. Помимо этого, популяция G^{Alert} клеток, находящихся в состоянии неглубокого покоя, включая ПГОК/МГОК, наблюдалась в высокорезистентных клетках U87 с *TAp53wt*.

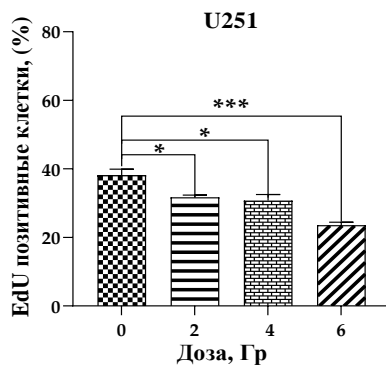


ДАПИ

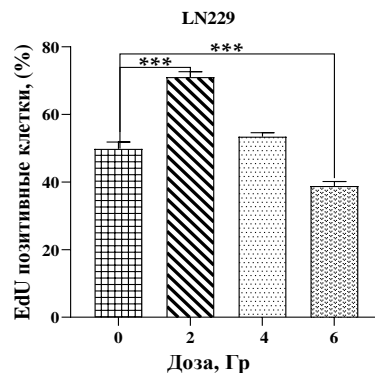
FITC

Merge

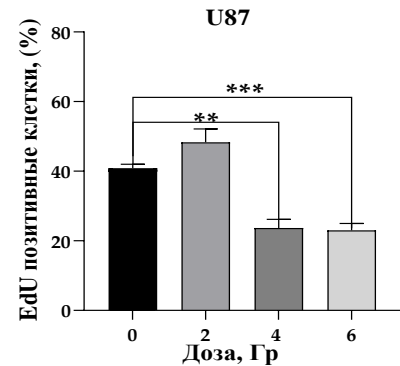
(А)



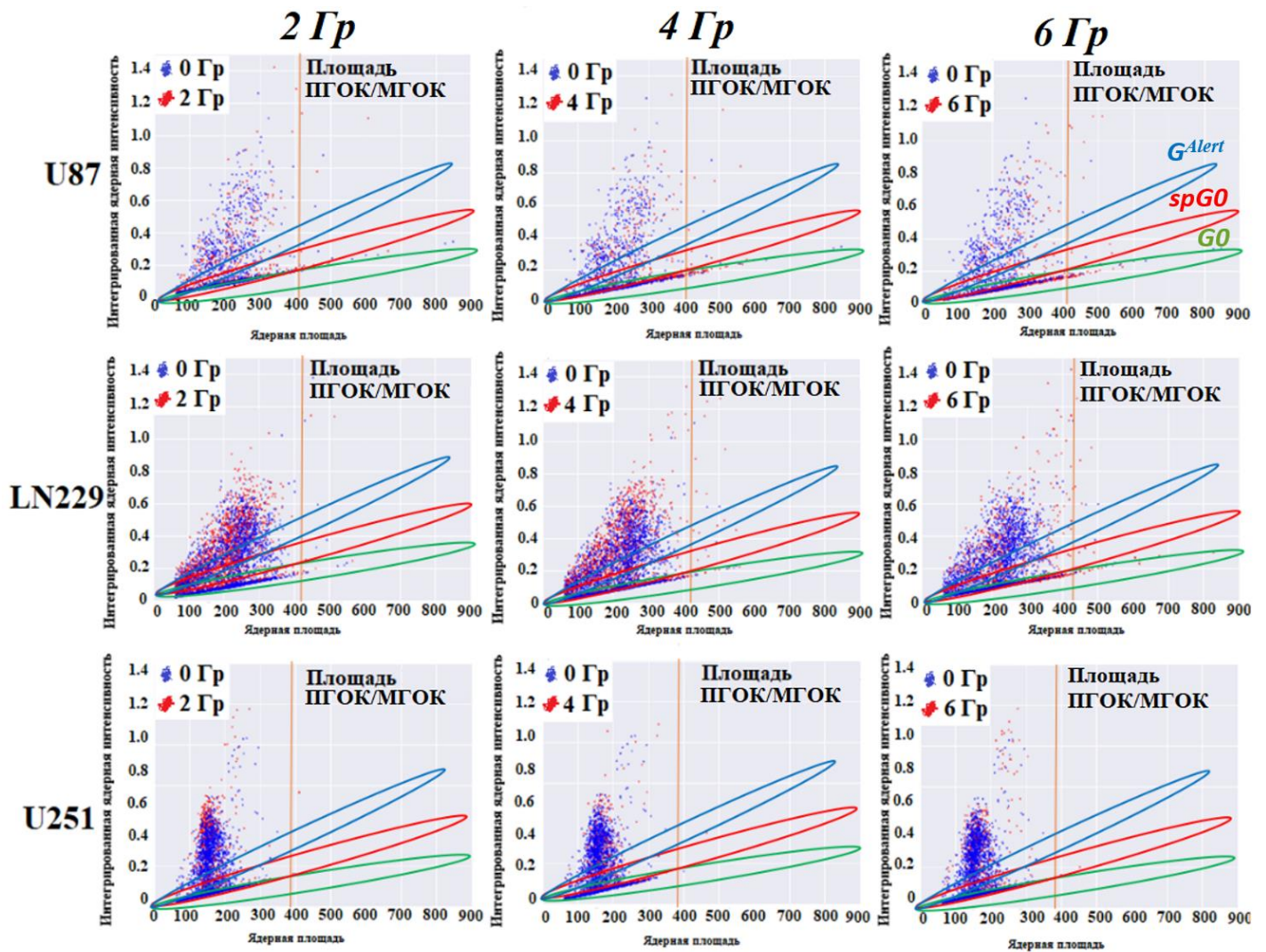
(Б)



(В)



(Г)

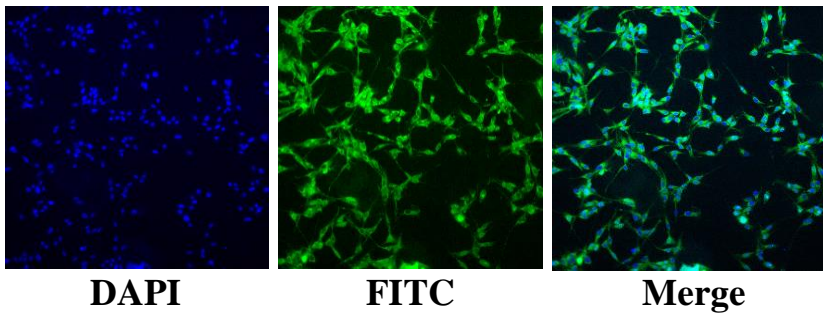


(Д)

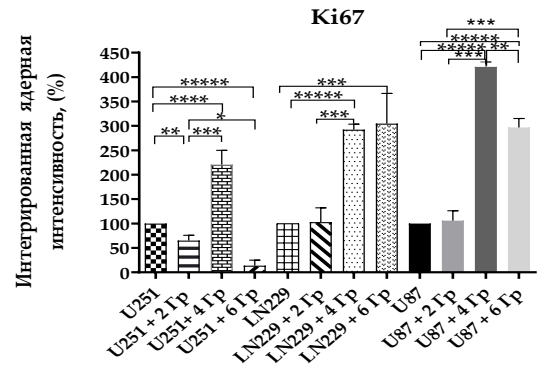
Рисунок 3.10. Оценка пролиферативной активности контрольных и облученных клеток ГБМ с помощью теста Click-IT EdU. (А) Репрезентативные иммунофлуоресцентные изображения EdU, включенного в ДНК, при увеличении (x10). Оценка пролиферативной активности в клетках ГБМ. Изменения пролиферативной активности клеток ГБМ (% EdU-позитивных клеток) через 24 часа после облучения: (А) U251, (Б) LN229, (В) U87. (Г) с помощью автоматизированной флуоресцентной микроскопии ImageXpress Micro XL и

мультипараметрического количественного анализа высокого разрешения (High Content Imaging and Analysis). Была проанализирована флуоресценция EdU в ПГОК через 24 часа после облучения в дозах 2 - 6 Гр (красные точки) и контроле (0 Гр, синие точки). В соответствии с литературными данными площадь ядра 400 мкм^2 была использована в качестве порога при оценке ПГОК. Зеленые круги демонстрируют область низкого EdU «покоящихся» клеток. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

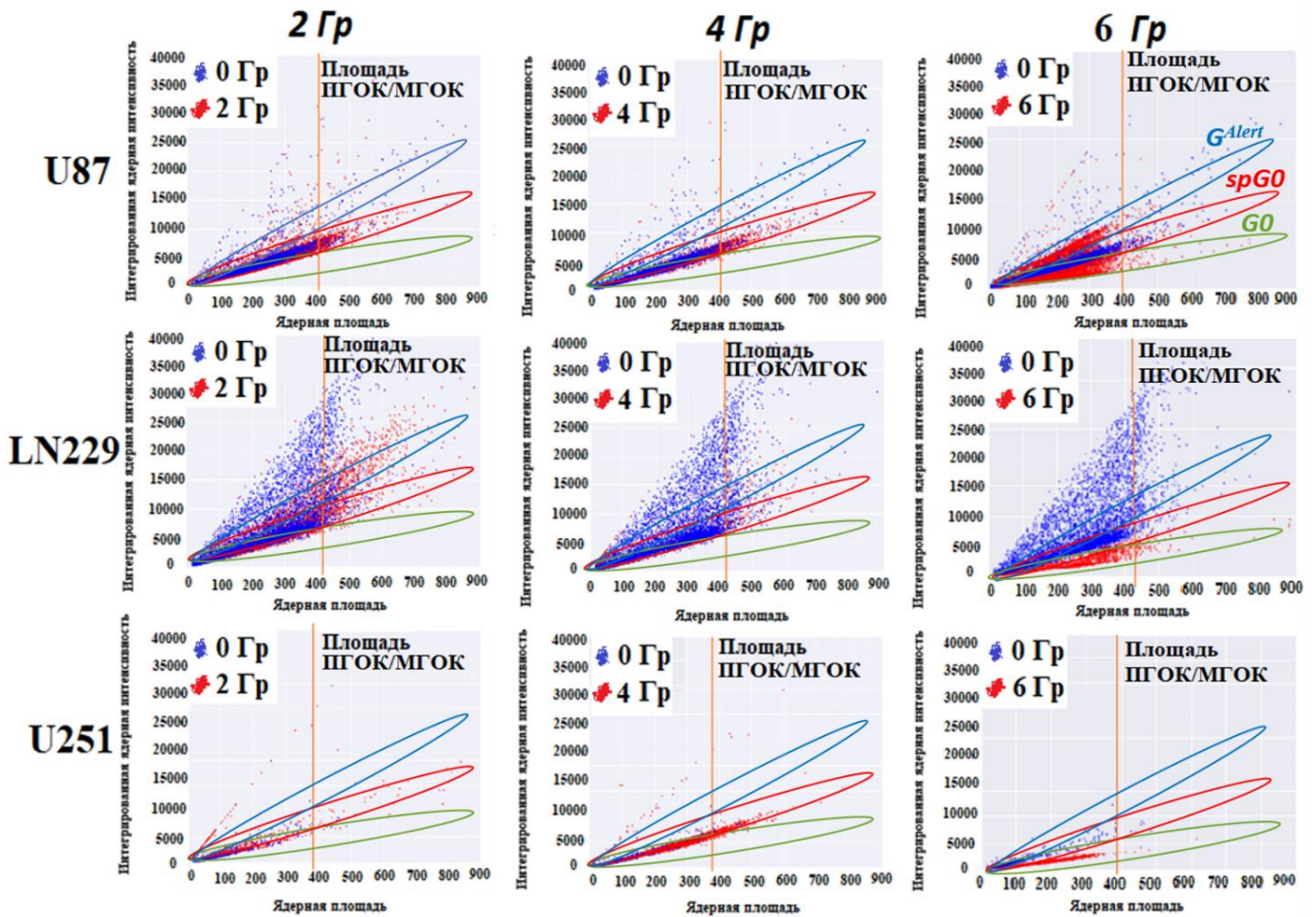
Важно отметить существенное (в 3 - 4 раза) увеличение доли Ki67+ клеток в ответ на облучение 4 - 6 Гр в основной массе LN229 и U87 клеток, имеющих функционально активный в трансактивации *TAp53* (Рис. 3.11). Впервые было продемонстрировано, что лучевое воздействие вызывает образование дормантных ПГОК/МГОК, имеющих наибольшую площадь ядер и пониженную репликацию ДНК и экспрессию Ki67 (Рис. 3.11 Д, 3.10 В). Ответ на облучение 6 Гр сопровождался появлением популяции G0 клеток, находящихся в состоянии глубокого покоя во всех клеточных линиях независимо от их *p53/P TEN* активности. Образование ощутимого количества медленно делящихся ПГОК/МГОК, находящихся в состоянии покоя происходило в клеточных линиях с *TAp53* (либо дикого (U87), либо мутированного (LN229), в отличие от клеток с *GFP53mut*, где наблюдались единичные такие клетки. Помимо этого, почти такая же популяция G^{Alert} клеток находящихся в состоянии неглубокого покоя, включая ПГОК/МГОК, образовывалась только в высоко радиорезистентных U87 клетках с *TAp53wt*.



(А)



(Б)



(В)

Рисунок 3.11. Проллиферативная активность облученных клеток ГБМ через 24 ч после воздействия ИИ. (А) Репрезентативные

иммунофлюоресцентные изображения Ki67-позитивных клеток при увеличении (x20). (Б) Изменения пролиферативной активности клеток ГБМ через 24 ч после воздействия рентгеновских лучей в дозах 2 - 6 Гр. (В) Высококоонтентный анализ интенсивности Ki67 в клетках ГБМ через 24 часа после облучения в дозах 2 - 6 Гр (красные точки) и контроле (0 Гр, синие точки). Зеленые круги показывают область низкого количества Ki67 в «покоящихся» (G0/G1 арестованных) клетках. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ***** $p < 0,00001$.

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

Через 72 часа после облучения только в дозе 6 Гр метаболическая активность в клеточной линии с *GOFp53mut* (U251) значительно снижалась по сравнению с необлученными клетками (Рис. 12 А, Б, В).

В противоположность этому, обе клеточные линии LN229 и U87 с генотипом *TAp53*, 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. 12 Е). Вместе с тем, значительное снижение метаболической активности через 72 ч в двух других менее устойчивых к облучению клеточных линиях (Рис. 3.12 А, Б) не оказало значительного влияния на их миграционные характеристики после облучения (Рис. 3.12 Д, Е).

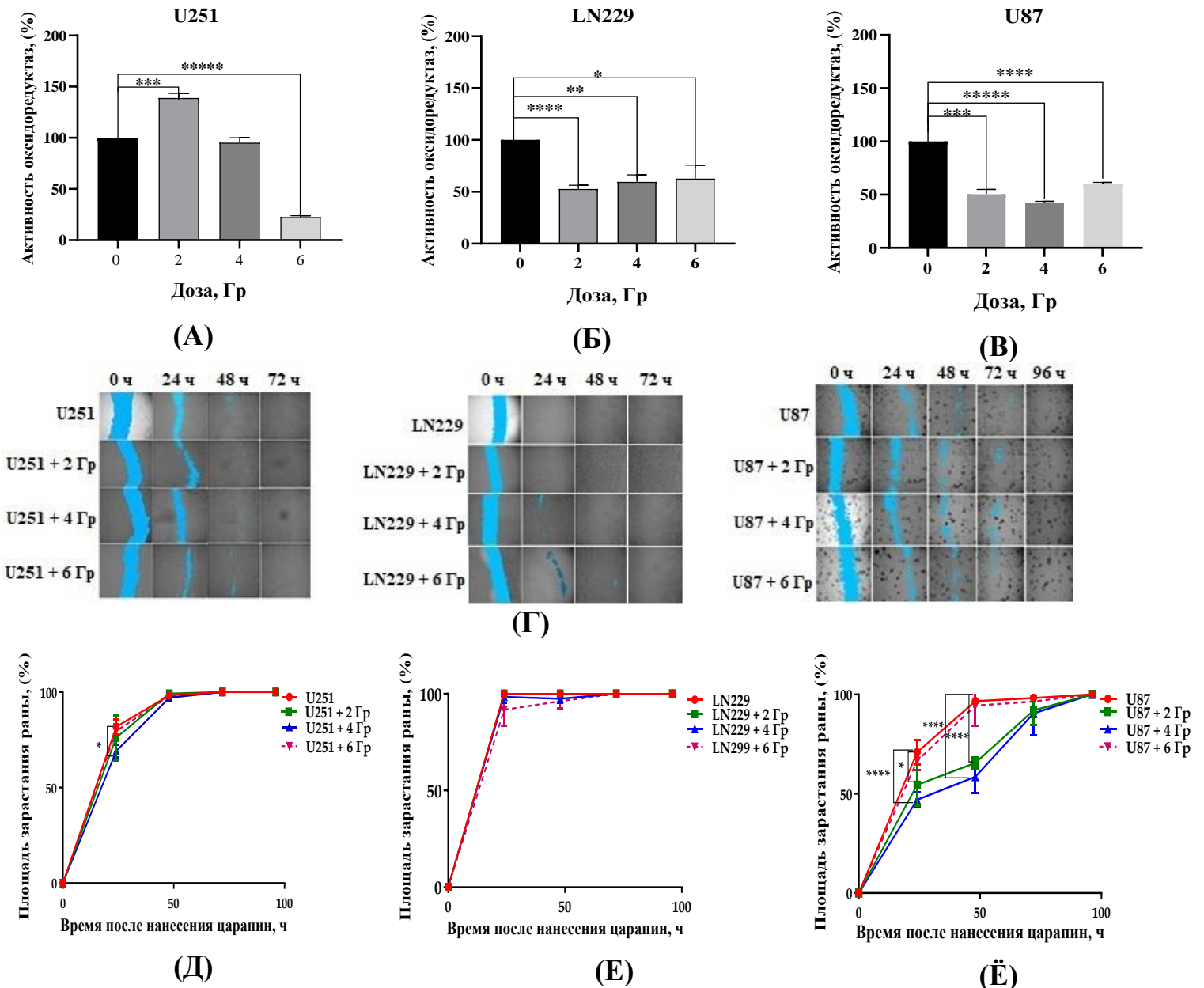


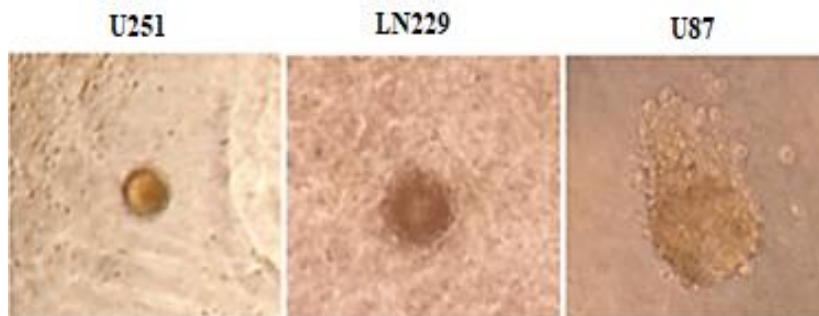
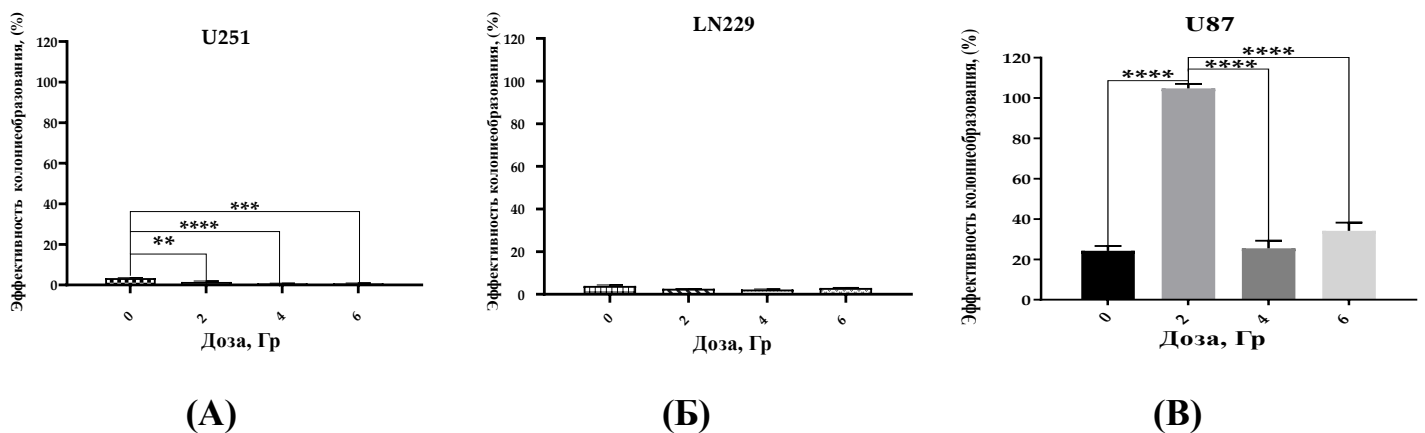
Рисунок 3.12. Результаты анализа активности оксидоредуктаз клеток (МТТ-тест) U251(А), LN229 (Б) и U87 (В) через 72 часа после облучения. (Г) Репрезентативные изображения заживления клеток ГБМ в Scratch-тесте *in vitro* через 24, 48, 72 и 96 часов после нанесения царапин на монослое клеток. Результаты анализа миграционной активности клеток U251(Д), LN229 (Е) и U87 (Ё) через 24, 48, 72 и 96 часов после облучения. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.12 Способность клеток ГБМ к репопуляции после облучения

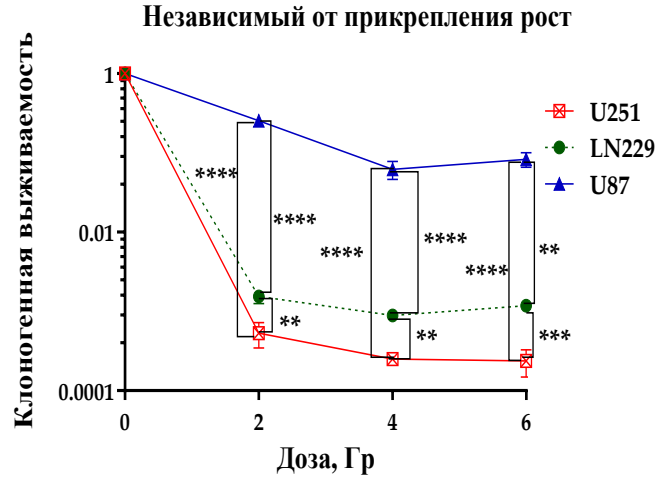
Независящий от прикрепления к субстрату рост опухолевых клеток является отличительной чертой их резистентности к разновидности апоптоза называемой аноикисом (по англ. anoikis), регулируемым адгезией к субстрату, и является первым шагом к метастазированию опухоли. Клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются плохо изученными. Чтобы определить, отличаются ли опухолевые клетки с различным генотипом и растентностью по способности к сохранению репродуктивной активности в качестве адаптационного ответа клеток линий ГБМ на стресс, индуцированный рентгеновским излучением, мы использовали анализ образования колоний в мягком агаре. Результаты представлены на Рис. 3.13.

Наблюдаемые РЖ клетки, полученные из U87 клеток, могут происходить в результате отпочковывания от ПГОК/МГОК и/или асимметричного деления этих клеток. Было предположено, что эти новые клетки, образованные в результате неоза, могут быть ответственны за репопуляцию опухолевых клеток. Анализ образования колоний в мягком агаре показал почти 5-кратное увеличение эффективности колониеобразования после облучения клеток U87 в дозе 2 Гр (Рис. 3.13 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 не влияло (LN229) или 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. 3.13 Д).

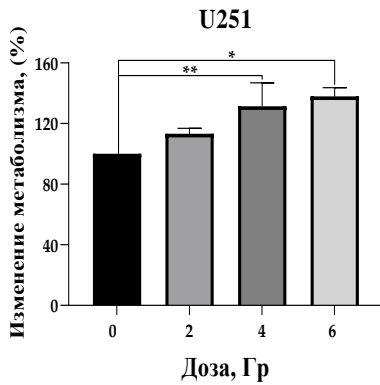
Примечательно, что клетки U251 образовывали более плотные колонии по сравнению с клетками LN229 и U87 (Рис. 3.13 Г). Большинство колоний, полученных из U87, были диффузными с ореолом клеток, мигрирующих в агар, что указывает на наиболее высокую инвазивность клеток, составляющих колонию. Интересно, что 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. 13 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 *TAp53wt* U87.



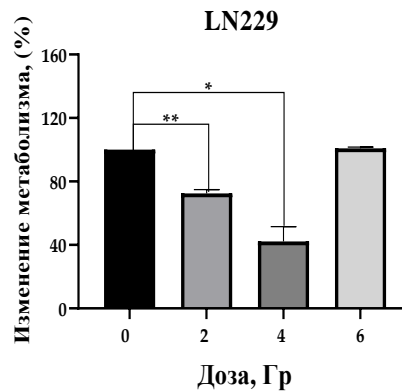
(Г)



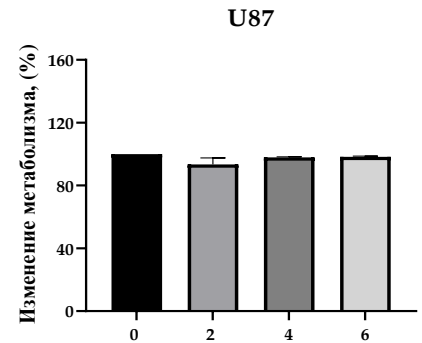
(Д)



(Е)



(Ё)



(Ж)

Рисунок 3.13. Эффективность колониеобразования (А) U251, (Б) LN229 и (В) U87 в мягком агаре после воздействия ИИ в дозах 2 - 6 Гр. (Г) Клоногенная выживаемость при независимом от прикрепления росте клеток. (Д) Микроскопические изображения, иллюстрирующие трехмерную структуру клеток ГБМ в мягком агаре. Оценка жизнеспособности клеток (Е) U251, LN229 (Ё) и U87 (Ж) через неделю после облучения в дозах 2 - 6 Гр с помощью AlamarBlue теста в мягком агаре. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.13 Влияние рентгеновского излучения на экспрессию FRA1 в клетках ГБМ

Механизм ЭМП не только заставляет ПГОК/МГОК демонстрировать соответствующие черты опухолевых стволовых клеток, но и является частью причины метастазирования опухолевых клеток, тем самым связывая стволовость и склонность к метастазированию у ПГОК/МГОК. 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 значимого влияния на экспрессию FRA1 в клетках LN229 (Рис. 3.14 Б).

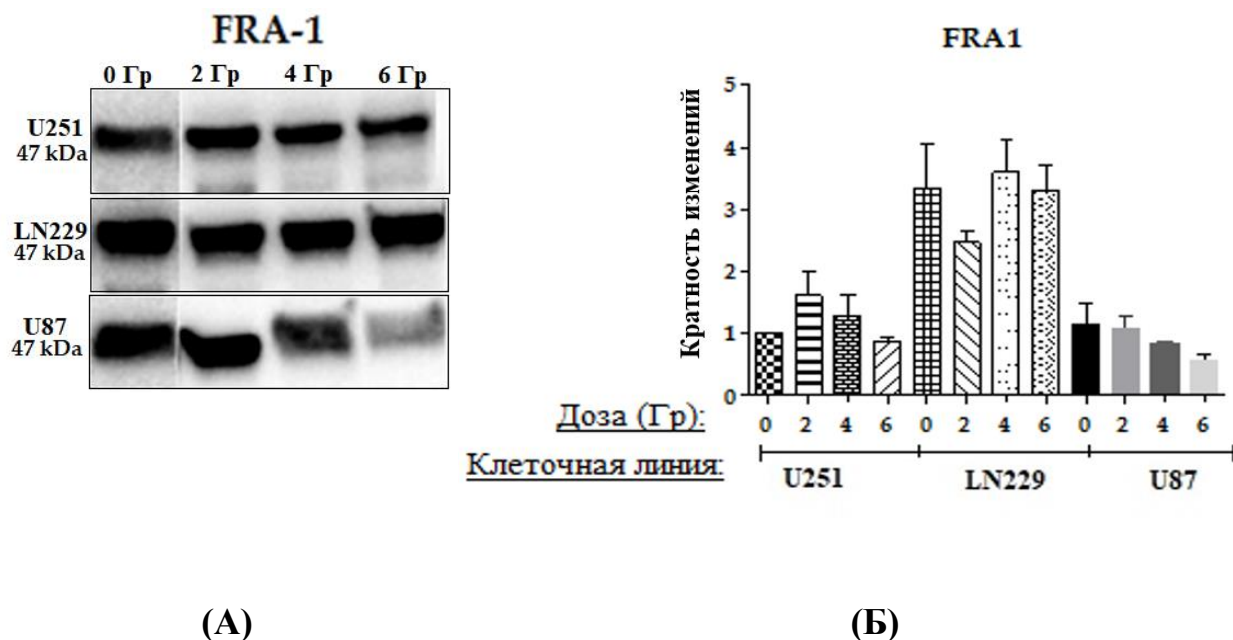


Рисунок 3.14. (А) Вестерн-блоттинг и (Б) Количественный анализ экспрессии FRA1 в клетках ГБМ различных линий, облученных в дозах 2 - 6 Гр.

Поэтому мы предположили, что воздействие ИИ существенно не влияет на экспрессию FRA1 в облученных клетках ГБМ независимо от их PTEN активности. Эти результаты могут свидетельствовать о возможной роли другого транскрипционного фактора/ов, такого/их как Twist, Snail, Zeb-1/2, в поддержании радиорезистентности, клоногенной выживаемости и репопуляции опухолевых клеток, распространении и приобретении ЭМП-подобных фенотипов в клетках ГБМ человека после рентгеновского облучения. В качестве альтернативы видится исследование фосфорилирования FRA1, которое является модификацией, необходимой для формирования комплекса FRA1-JunB.

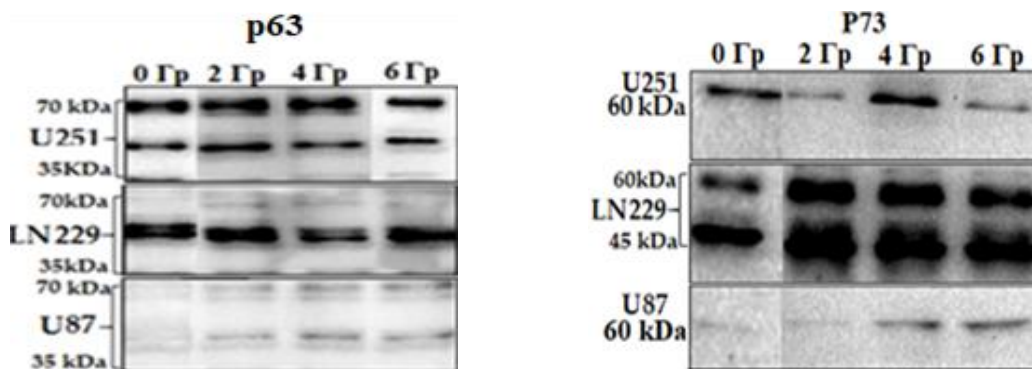
3.14 Экспрессия белков семейства p53 в клетках ГБМ в ответ на облучение

Доминантно-негативные мутации (Gain-of-Function) в белке p53 (*GOF mut-p53*) недостаточно изучены в ГБМ. Большинство исследований p53 в ГБМ не смогли обнаружить различие между клетками с делециями в гене *TP53* и *GOF mut-p53*. Хорошо известно, что, в отличие от *wt-p53*, *GOF mut-p53* проявляет себя, взаимодействуя с различными факторами транскрипции (например, SREBP, VDR, Sp1, ETS2, NFR2, p73, p63), которые способствуют инициации и прогрессированию опухоли. P73 и p63, члены семейства p53-белков, структурно и функционально гомологичны p53, и было показано, что они восстанавливают опухоль-супрессирующие функции p53 в его отсутствие или при наличии *mut-p53*. Однако, как и *wt-p53*, эта активность ингибируется белок-белковыми взаимодействиями между *mut-p53* и p63/p73. Кроме того, ингибирование *mut-p53* белков p63 и p73 способствует инвазии опухолевых клеток. Ген *PTEN* индуцируется p53 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 *TAp53/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. 15 А).

Следует отметить, что в клетках U87, содержащих *TAp53wt*, увеличение p63 было выше (3,4 - 2,5 раза в зависимости от дозы) по сравнению с клетками U251, несущими *GOF p53mut*, где увеличение составило только 1,2 - 1,4 раза. Напротив, облучение клеток LN229, несущих *PTENwt* и *TAp53mut*,

значительно увеличило (>10 и > 2 раз) экспрессию белка p73 после облучения в дозе 2 и 4 Гр, соответственно (Рис. 3.15 Б). 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 *PTEN^{wt}* может быть связано с повышенной склонностью *TAp53^{wt}* клеток к репопуляции (Рис. 3.13), тогда как подъем экспрессии p73 при наличии *PTEN^{wt}* снижает эту склонность не смотря на изначально повышенное образование МГОК клетками LN229 (Рис. 3.9). 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.



(A)

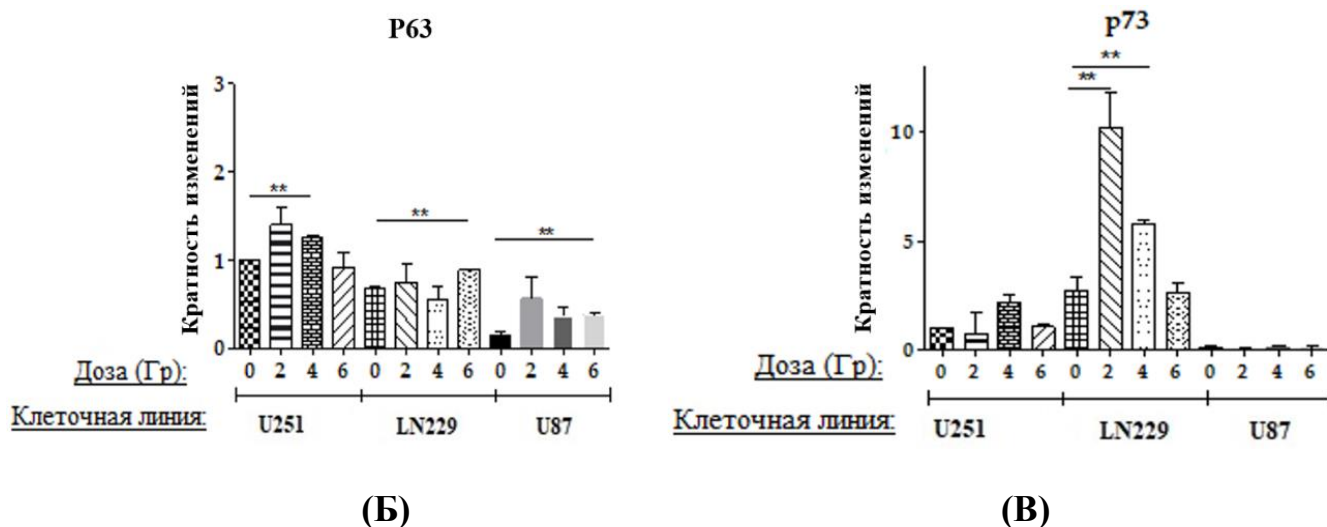


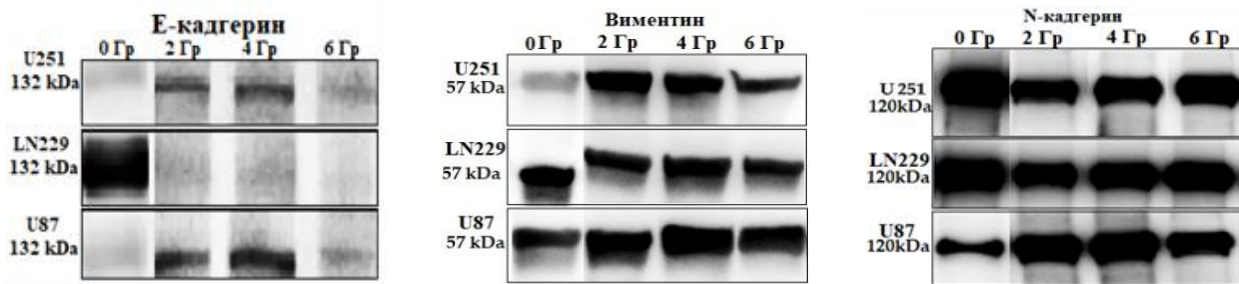
Рисунок 3.15. Вестерн-блоттинг (А) и количественный анализ экспрессии р63 (Б) и р73 (В) в облученных клетках ГБМ в дозах 2 - 6 Гр по сравнению с соответствующим контролями. Данные представляют собой среднее \pm стандартная ошибка трех независимых экспериментов. ** $p < 0,01$.

3.15 Молекулярные маркеры ЭМП в клетках ГБМ в ответ на облучение

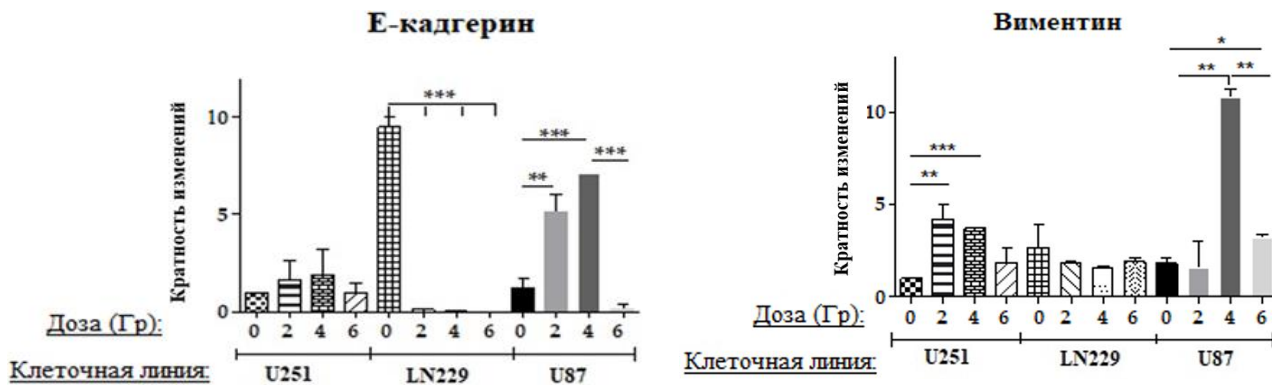
Обнаружение того, что экспрессия р63/р73 значительно повышено в клетках ГБМ, вызвало наш интерес к ассоциации их экспрессии с развитием признаков ЭМП, способствующих миграции клеток ГБМ после воздействия ИИ. Виментин и N-кадгерин могут поддерживать клеточную целостность и участвовать в нескольких клеточных сигнальных путях, модулирующих подвижность и инвазию раковых клеток. До сих пор неясно, регулирует ли *p53* непосредственно ген, кодирующий Кадгерин. Поэтому, мы оценили паттерны экспрессии белка E-кадгерина, N-кадгерина и виментина в качестве классических маркеров ЭМП в линиях клеток ГБМ человека, используя анализ с помощью вестерн-блоттинга.

Образование ПГОК/МГОК в клеточных популяциях линий клеток ГБМ сопровождалось изменениями экспрессии E- и N-кадгеринов и Виментина в

ответ на различные дозы облучения (Рис. 3.16 Б, В, Г). В *PTEN*-дефицитных клеточных линиях облучение индуцировало смешанный фенотип ЭМП. В частности, только в наиболее радиорезистентных клетках U87 с *TAp53wt/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.

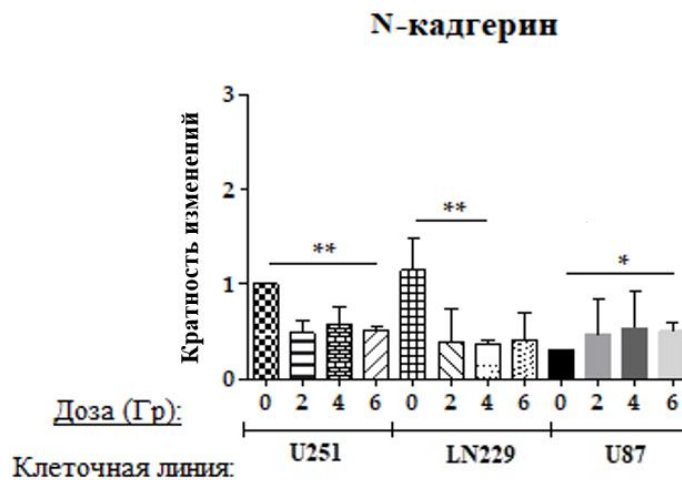


(А)



(Б)

(В)



(Г)

Рисунок 3.16. Вестерн-блоттинг (А) анализ экспрессии маркеров, связанных с ЭМП Е-кадгерина (Б), Виментина (В) и кадгерина (Г) в клетках ГБМ, облученных в дозах 2 - 6 Гр, по сравнению с соответствующими контролями. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Облученные *GOF p53mut/PTENmut* U251 клетки экспрессировали значительно больше Виментина при значительном снижении экспрессии N-кадгерина. В присутствии *PTENwt* облученные клетки с *TAp53mut* (LN229) экспрессировали наименьшее количество всех 3 маркеров ЭМП, при чем любая из выбранных доз ИИ значительно снижала экспрессию обоих кадеринов (более чем в 63 и 3 раза для Е- и N-кадгерина соответственно) без статистически значимого влияния на экспрессию виментина в клетках с *TAp53mut* (LN229) (Рис. 16 А, Б и В).

Таким образом, отсутствие *PTEN* в *p53wt* 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 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

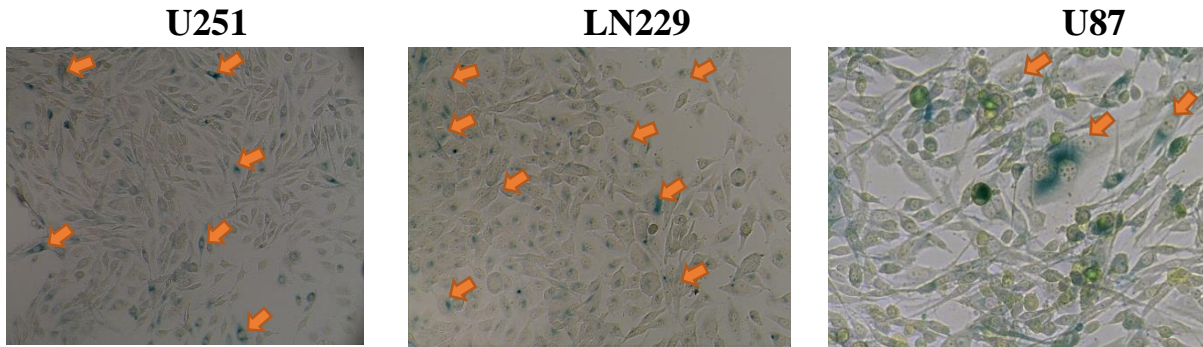
Клетка должна покинуть клеточный цикл, чтобы стать покоящейся (дормантной): либо спящей, либо стареющей. Наблюдаемая нами картина бифуркации окрашивания Ki67 (Рис. 3.11) может указывать на то, что вскоре после генотоксического стимула поврежденные клетки ГБМ покидают клеточный цикл. Мы предложили, что те клетки, которые успешно восстанавливаются после повреждения ДНК, снова входят в клеточный цикл, в то время как клетки с непоправимыми повреждениями старели. Стареющие клетки также либо не экспрессирующими, либо слабо экспрессирующими Ki67, имитируя клетки, находящиеся в состоянии полного покоя G₀. Повышенный уровень ассоциированной со старением активности фермента бетта-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 имеющих наиболее распространенный набор мутаций TP53 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. 17 Б), тогда как доля тех же клеток в линиях U251 и LN229 не изменялась (Рис. 17 А и В).

Важно отметить, что, в отсутствие *PTEN*, облучение в дозе 2 Гр вызывала статистически значимое 2-кратное увеличение доли SA-β-Gal⁺ МГОК только в p53^{wt} линии U87, демонстрируя лишь тренд к увеличению той же фракции

в *GOF TAp53mut* клетках U251. При этом, при наличии *PTENwt*, только облучение в дозе 4 Гр лишь незначительно увеличивало фракцию SA- β -Gal+ МГОК в *TAp53mut* LN229 клетках.

Основная масса клеток



(A)

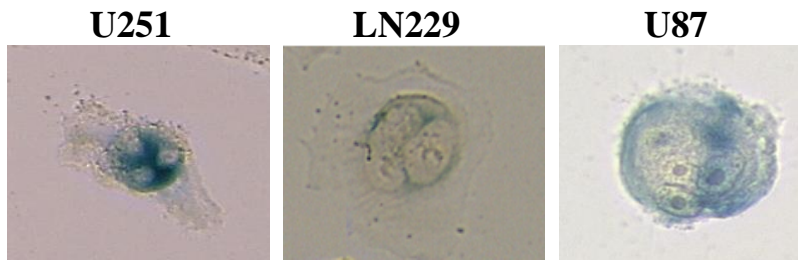
LN229

(B)

U87

(B)

МГОК
LN229



U251

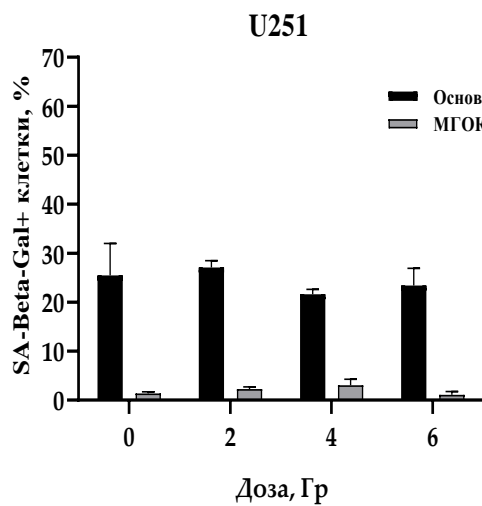
(Г)

LN229

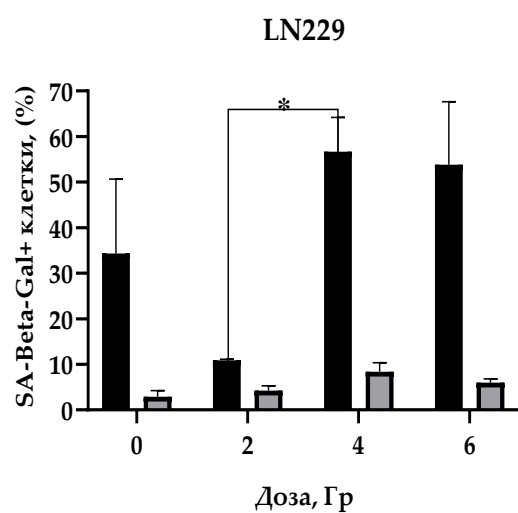
(Д)

U87

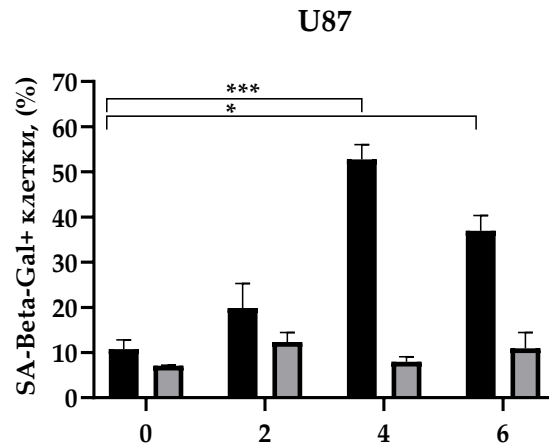
(Е)



(Е)



(Ж)



(3)

Рисунок 3.17. Анализ SA- β -Gal позитивных клеток 24 часа после рентгеновского облучения. Изображения SA- β -Gal позитивных клеток (А-В) (указаны стрелками – цитоплазма окрашена в темно-зеленый цвет) и отдельных МГОК (Г- Е) при увеличении (x10). Изменение доли (%) SA- β -Gal позитивных клеток в контрольных и облученных клеточных популяциях (Ё) U251, (Ж) LN229 и (З) U87 через 24 часа после воздействия. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

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 *TAp53wt*, а не в *GOF TAp53mut* клетках ГБМ.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований были получены новые данные о влиянии фракционированного облучения в суммарной дозе 60 Гр с двумя различными режимами фракционирования дозы на фенотипические и молекулярные характеристики выживших и давших устойчивый рост клеток НМРЛ А549 (*p53* дикий-тип) и Н1299 (*p53* дефицитные), а также были получены новые данные об особенностях начальных клеточно-молекулярных событий при формировании ответа на генотоксический стресс, вызванный однократным облучением в терапевтических дозах радиорезистентных клеток ГБМ с различным генотипом онкосупрессоров.

Проведенный фенотипический анализ морфологии выживших радиорезистентных клеток (Рис. 3.1.А) показал, что воздействие фракционированного облучения может привести к появлению морфологических признаков, характерных для ЭМП: потере межклеточных контактов и увеличению числа жизнеспособных веретеновидных и/или округлых клеток в с плохой адгезией, влияющей на эффективность прикрепления этих клеток на поверхность культурального пластика. Причем выраженность этих признаков была выше у сублиний Н1299DE и Н1299S, лишенных *p53*, по сравнению с сублиниями А549 клеток, имеющих *p53* дикого типа. Этот более выраженный ЭМП фенотип Н1299DE и Н1299S клеток был подтвержден значимым увеличением экспрессии мезенхимального маркера Виментина (Рис. 3.5.В) при крайне низкой (за пределами чувствительности метода) экспрессии эпителиального маркера Е-кадгерина (Рис.3.5. Б). Справедливости ради следует отметить, что обе радиорезистентные сублинии клеток А549 также демонстрировали классический паттерн ЭМП маркеров: значимое снижение Е-кадгерина и повышение другого мезенхимального

маркера N-кадгерина (рис.3.5.Г). В целом наши данные соответствуют активно обсуждаемой в настоящее время концепции участия *p53* в регуляции E-кадгерин-опосредованной адгезии опухолевых клеток.

ЭМП играет центральную роль в метастазировании опухоли [338]. Наши данные показали, что режим FDE, вероятно, вызывает частичную активацию программы ЭМП в выживших клетках НМРЛ после фракционированного облучения либо за счет активации Виментина в клетках *p53null*, либо за счет aberrантной активации N-кадгерина в клетках *p53wt*. Удивительно, режим FDE значительно снижает миграцию клеток *p53wt* A549DE до 72 часов, в то же время значительно замедляя миграцию *p53null* H1299DE только до 48 часов и возвращаясь к уровням родительских клеток к 72 часам (Рис.3.5.Д). Режим SF, вероятно, меньше влияет на активацию ЭМП независимо от наличия функционально-активного *p53* в выживших после фракционированного облучения линий клеток НМРЛ (Рис.3.5.Е). Соответственно, режим SF не оказывал значительного влияния на горизонтальную 1D-миграцию клеток НМРЛ, переживших фракционированное облучение, хотя и облегчал их миграцию через 24 часа после нанесения раны на клеточном монослое. В целом эти данные свидетельствуют о том, что режим фракционированного облучения значительно модулирует частичную активацию программы ЭМП, влияя на 1D ограниченное миграционное поведение (заживление ран-царапин в клеточном монослое) выживших после фракционированного облучения клеток НМРЛ независимо от наличия функционально-активного *p53*.

Потеря E-кадгерина и индукция только Виментина не обязательно указывают на активацию программы ЭМП [339, 340]. ЭМП представляет собой сложный гетерогенный процесс, который способствует значительной фенотипической изменчивости, наблюдаемой в способах инвазии опухолевых клеток [341]. Особенности программ ЭМП, необходимые для инвазии

отдельных клеток, вероятно, способствуют оппортунистической инвазии, если активируются как часть специфической гибридной программы ЭМП. Однако назначение определенных функций этого процесса требует экспериментального подтверждения. Таким образом, наши данные могут указывать на существование специфического гибридного ЭМП, измененного различными режимами фракционированного облучения, который может относиться не только к экспрессии канонических маркеров ЭМП, но и к нижестоящему сигнальному событию, координированному более сложной программой ЭМП.

Важно, что повышение морфологических признаков ЭМП у H1299DE и H1299S клеток сопровождалось драматическим снижением экспрессии p53 и p73, членов p53 семейства транскрипционных факторов (Рис.3.7), но не коррелировало с не измененной при фракционированном облучении экспрессией другого транскрипционного фактора FRA1 (Рис. 3.6.), промотора многих злокачественных новообразований, значительно способствующего росту, подвижности и инвазии эпителиальных клеток легких человека [334]. FOS-родственный антиген-1 (FRA1) является членом семейства FOS и тесно связан с подвижными и инвазивными фенотипами опухолевых клеток. Высокая экспрессия FRA1 всегда указывает на метастазирование и плохой прогноз при различных опухолевых заболеваниях человека [123]. В клетках рака легких, повышенный уровень FRA1 может ингибировать p53 и увеличивать уровень его негативного регулятора MDM2, в конечном итоге подавляя апоптоз клеток рака легких за счет увеличения связанного с апоптозом потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$) и подавления внутриклеточных АФК и агрегации Ca^{2+} [130]. Наши исследования продемонстрировали снижение уровней апоптоза после дополнительного однократного облучения рентгеновскими лучами выживших после

фракционированного облучения клеток *p53null* H1299IR по сравнению с родительскими клетками H1299 [342]. Уровень базальной экспрессии FRA1 в клетках *p53null* H1299 достоверно ($p < 0,01$) превышал таковой у клеток *p53wt* A549. Экспрессия FRA1 в выживших после фракционированного облучения клетках *p53null* (H1299DE и H1299S) также была значительно ($p < 0,001$, $p < 0,05$, соответственно) выше, чем в родительских клетках *p53wt* и выживших после фракционированного облучения клетках (A549DE и A549S), независимо от применяемого режима фракционированного облучения. С другой стороны, мы не смогли найти значительных различий в экспрессии FRA1 между родительскими клетками и их выжившими сублиниями после любого режима фракционированного облучения независимо от наличия *p53*. Таким образом, наши текущие данные предполагают, что другие фактор/ы транскрипции, помимо FRA1 (например, *Zeb1*), могут участвовать в поддержании ЭМП-подобного фенотипа, радиорезистентности, снижение апоптоза и миграционного поведения выживших после фракционированного облучения клеток НМРЛ. Механизмы повышенных уровней FRA1 в *p53null* клетках и их выживших после фракционированного облучения сублиниях все еще неясны, что требует дальнейших исследований.

ПГОК приобретают мезенхимальный фенотип, который коррелирует с повышенными уровнями экспрессии транскрипционных факторов ЭМП [15]. Одновременно комбинированная потеря *p73* и *p53* приводит к быстрому увеличению полиплоидии и анеуплоидии, по сравнению с потерей только *p53* [343, 344]. В частности, отсутствие *p73* позволяет клеткам ослаблять контрольную точку сборки митотического веретена и становиться полиплоидными и многоядерными. Мы впервые продемонстрировали, что значительная потеря экспрессии *p73* сопровождается увеличением доли

полиплоидных клеток в клетках *p53null* H1299DE и H1299S и клетках *p53wt* A549S.

Показано, что индуцибельная дисфункция теломер эмбриональных фибробластов мыши приводила к увеличению пloidности за счет эндоредупликации с участием АТМ/ATR и в отсутствие онкосупрессора *p53* [345]. *p53* играет решающую роль в регулировании контрольной точки G1/S, когда клетки с содержанием ДНК (2N) останавливаются перед репликацией ДНК, и контрольной точке G2/M, когда клетки с содержанием ДНК (4N) останавливаются перед митозом. Тетраплоидные клетки демонстрировали высокий уровень туморогенеза после трансплантации мышам с ослабленным иммунитетом, тогда как изогенные диплоидные клетки этого не делают. Это происходило только при отсутствии функционального *p53*, поскольку в тех же условиях тетраплоидные клетки, экспрессирующие *p53wt*, не размножались [61].

Образование ПГОК/МГОК после терапевтического вмешательства как правило связано с резистентностью опухоли и увеличением субпопуляции клеток с характеристиками ОСК. Увеличенный геномный материал полиплоидных клеток позволяет им пережить лучевую терапию. ПГОК показали значительно более высокую частоту геномной нестабильности, чем диплоидные опухоли [346]. Абберрантные полиплоидные клетки могут возникать в результате слияния клеток, эндоредупликации, недостаточности цитокинеза или отмены контрольной точки митоза [292, 347]. Эндоредупликация описывается в двух формах: эндоциклы и эндомитоз. Эндоциклы состоят из чередующихся периодов S-фазы репликации ДНК и периодов фазы G1, в течение которых клетки готовятся к следующему циклу S-фазы. Эндоциклические клетки не подвергаются митозу. Напротив,

эндомиотические клетки выполняют прерванный митоз с последующим повторным входом в S-фазу без деления клеток.

В отсутствие функционального *p53* в стресс-адаптивной реакции на облучение могут действовать другие члены семейства *p53*, такие как *p63* и *p73*. BRCA2, Rad51 и *mre11* были показаны как транскрипционные мишени для *p63* и *p73* [348]. *p63* является основным транскрипционным фактором плюрипотентности стволовых клеток, и его функция имеет решающее значение для развития базального эпителия, дифференцировки и предотвращения старения [349, 350]. Известно, что изоформы *p73* проявляют аналогичную транскрипционную активность *p53* в клетках *p53null* H1299. Анализ экспрессии *p63* в дифференцирующихся кератиноцитах предполагал, что экспрессия *p63* не влияет на полиплоидию этих клеток.

Нами впервые было показано, что значимое повышение доли ПГОК (Рис.3.8.Б) относительно изогенных родительских линий клеток наблюдалась в только в радиорезистентных клетках A549S и H1299DE, имеющих значимое снижение доли ДНК-реплицирующих клеток (в S-фазе клеточного цикла) (Рис. 3.3.А), а также значимое снижение экспрессии *p73* (Рис. 3.7.В). Основная форма *p73* - это полноразмерный TAp73, который приводит к рекрутированию членов комплекса AP-1 для нацеливания генов промоторов c-Jun-зависимым образом и усиления клеточного роста [351]. В нашем исследовании базальный уровень *p73* в клетках *p53null* H1299 значительно превышал его уровень в клетках A549 и резко снижался в выживших сублиниях после фракционированного облучения независимо от режима фракционирования. Эти наши новые данные являются подтверждением недавно высказанного предположения, что *p73* снижает полиплоидию [352], однако мы показали, что это происходит не обязательно в отсутствие *p53*, как предполагалось ранее [343]. Таким образом, наши данные проливают свет на возможные механизмы,

вовлечены в формирование ПГОК у этих выживших после фракционированного облучения радиорезистентных клеточных линий НМРЛ. Наиболее вероятно, что повышение доли ПГОК не связано с наличием p53, скорее при его отсутствии или наличии в нем инактивирующих мутаций, повышенное образование ПГОК в радиорезистентных сублиниях наблюдается в результате применения любого режима фракционированного облучения через аттенуацию экспрессии p73.

Вместе с тем, наши данные не исключают возможную роль других изоформ p73 в онкогенезе, активно дискутируемую в самое последнее время [353]. Например, стабильная сверхэкспрессия $\Delta Np73\beta$ в клеточной линии H1299 нарушала геномную стабильность опухолевых клеток, приводя к образованию тетраплоидных клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что $\Delta Np73\beta$ -индуцированный аберрантный митоз уклоняет от контроля контрольной точки сверки митотического веретена, что приводит к тетраплоидии и гибели клеток через митотическую катастрофу, а не через апоптоз [354]. С этой точки зрения обнаруженное нами значительное увеличение полиплоидности в клетках H1299DE и H1299S по сравнению с их родительскими клетками (Рис.3.8.Б) не исключает возможное увеличение изоформы $\Delta Np73\beta$ (в отличие от огромного снижения изоформы TAp73) как разумное объяснение наблюдаемых нами явлений полиплоидии после воздействия фракционированного облучения. Это предположение мы собираемся проверить в наших следующих экспериментах.

Было показано, что тетраплоидные клетки, образованные во время теломерного кризиса, показали повышенную онкогенную способность по сравнению с диплоидными контрольными клетками в исследованиях на мягком агаре и имплантации мышам [355]. Увеличение фракций выживания клеток H1299DE и H1299S в мягком агаре (Рис.3.2) может быть связано с

большим количеством полиплоидных клеток с множественными ядрами. Эти гигантские полиплоидные клетки могут появляться в форме полиплоидных «букетов», которые впоследствии возвращаются в интерфазное состояние и разделяются на вторичные ядра с образованием жизнеспособных вторичных клеток, демонстрирующих анкоридж-независимый рост [286]. Следовательно, весьма вероятно, что клетки *p53null* НМРЛ, пережившие фракционированное облучение, обладают высокой туморогенностью и большим количеством полиплоидных клеток за счет значительного подавления экспрессии p63/p73 независимо от используемого режима фракционированного облучения.

Хорошо известно, что *p53* регулирует метаболические пути опухолевых клеток. *wtp53* является мощным супрессором TGF- β -индуцированного Nox4, NADPH-оксидазы семейства Nox, и миграции клеток в клетках H1299 [356]. Через пентозофосфатный путь (ПФП) *wtp53* подавляет продукцию NADPH, потребление и биосинтез глюкозы в опухолевых клетках [341]. Отсутствие p53 может способствовать способности опухолевых клеток продолжать пролиферацию в условиях дефицита питательных веществ [357]. Потеря функции *p53* связана с повышенной экспрессией фосфоглицератмутаза (ФГМ), которая может усиливать гликолиз и эффект Варбурга [358]. Клеточная пролиферация зависит от доступности глюкозы, ответ, который опосредуется активацией AMP-активируемой протеинкиназой (AMPK) [359]. *p53* транскрипционно индуцирует Sestrin 1/2 для активации AMPK, который подавляет активность mTORC1, что приводит к ингибированию гликолиза в клетках [360]. Мы наблюдали, что облучение в режиме FDE значительно снижает скорость продукции гликолитического NAD (P)H как выживших клеток НМРЛ *p53wt*, так и *p53null*. Этот режим, вероятно, снижает выработку NAD (P) H, что сопровождается снижением пролиферации выживших после фракционированного облучения клеток НМРЛ независимо от наличия

функционально-активного *p53*. Напротив, режим SF увеличивает долю метаболически активных пролиферирующих клеток *p53null* НМРЛ, выживших после фракционированного облучения, не влияя на метаболическую активность и снижая пролиферацию у *p53wt* клеток НМРЛ.

Необходимым условием для приобретения покоящегося фенотипа является регулирование потребности в энергии за счет снижения синтеза белка, в частности, Ki67. Белки, синтезированные до замедления трансляции белка, могут все еще присутствовать в клетках в фазе G0 с остаточной экспрессией Ki67, обнаруженной в клетках G0 [361]. Полиплоидные клетки приобретают свойства стволовых клеток и субпопуляции, обогащенные ОСК, которые проявляют характеристики активации программы ЭМП. Наши данные ясно показывают, что CD133+ A549 спонтанно (без воздействия ИИ) покоящиеся (МПК или Ki67^{low}/EdU^{low}) клетки не являются гомогенной популяцией (рис. 3.4, площадь АПК через 24 часа). В дополнение к основной популяции, имеющей как линейно связанные эти показатели пролиферации, так и показатели активности в клеточном цикле, клетки МПК состоят из клеток, имеющих переменную экспрессию Ki67 с постоянным EdU^{low} и переменную флуоресценцию, связанную с EdU, при постоянно самой низкой экспрессии Ki67. Эти наблюдения, по-видимому, согласуются с более ранним представлением о том, что высокая экспрессия Ki67 может быть контрselectивной при опухоли, что согласуется с открытием, что повышенные уровни Ki67 останавливают пролиферацию клеток [362]. Лечение с помощью ИИ, вероятно, повышает долю покоящихся опухолевых клеток за счет уничтожения большинства пролиферирующих опухолевых клеток и/или индуцирования пролиферирующих опухолевых клеток в состояние покоя.

REDD1 является еще одной мишенью транскрипции *p53*, участвующей в подавлении mTOR посредством опухолевого супрессорного комплекса TSC1/TSC2 [363]. REDD1 также является мишенью *p63* и индуцируется после повреждения ДНК и, по-видимому, участвует в регуляции АФК. TP63null фибробласты имели пониженный уровень АФК и пониженную чувствительность к окислительному стрессу [364]. Таким образом, мы поставили вопрос о том, может ли модуляция активности оксидоредуктаз и пролиферации в *p53null* клетках H1299DE и H1299S быть связанной с уровнем экспрессии *p63/p73*. Действительно, мы впервые продемонстрировали, что режим FDE привел к значительному снижению уровней экспрессии *p63* и *p73* в клетках *p53null* H1299DE в 2 и 5 раз, соответственно. Тот же режим не изменил экспрессию этих белков в клетках *p53wt* A549DE. Облучение в режиме SF приводило к тому, что клетки *p53wt* A549S экспрессировали значительно больше *p63* и меньше *p73*, чем родительские клетки, напротив подавляя экспрессию обоих белков в клетках *p53null* H1299S. Кроме того, наши данные о значительном подавлении *p63/p73* могут косвенно свидетельствовать о снижении уровней АФК и пониженной чувствительности к окислительному стрессу в выживших после фракционированного облучения клетках *p53null* НМРЛ.

Наличие функционально активного в трансактивации *TAp53* (дикого типа, либо мутированного) и управляемого им сигнального пути необходимы и достаточны для увеличения количества МГОК в ответ на облучение. *TAp53* дикого типа в наиболее радиорезистентных клетках необходим для достаточно быстрого (через 24 часа) образования дочерних клеток после облучения. Нами было обнаружено, что изменение доли МГОК в ответ на однократное облучение в терапевтически-релевантных дозах 2 - 6 Гр существенно различается для клеточных линий U87 (*TAp53wt/PTENmut*), LN229

(*TAp53mut/PTENwt*), U251 (*GOF p53mut/PTENmut*) (Рис. 3.8). 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 клетки U251 существенно не отличались от своего контроля. Было также обнаружено, что некоторые МГОК, полученные из U87 в отличие от клеток LN229 и U251, могут генерировать многочисленные небольшие моноклеарные клетки (называемые клетками Раджу или РЖ) и в конечном итоге образовывать клеточные колонии (процесс, называемый «неозисом») через 24 часа после облучения.

В ответ на облучение в клетках наблюдалось существенное различие в доле ДНК-реплицирующих клеток в S фазе (тест Click-IT™ EdU) и доле Ki67+ клеток (маркер скорости прохождения клеточного цикла). Важно отметить существенное (в 3 - 4 раза) увеличение доли Ki67+ клеток в ответ на облучение 4 - 6 Гр в основной массе LN229 и U87 клеток, имеющих функционально активный в трансактивации *TAp53* (Рис. 3.11). Впервые было продемонстрировано, что лучевое воздействие вызывает образование дормантных ПГОК/МГОК, имеющих наибольшую площадь ядер и пониженную репликацию ДНК и экспрессию Ki67 (Рис. 3.11 Д, 3.10 В). Ответ на облучение 6 Гр сопровождался появлением популяции G0 клеток, находящихся в состоянии глубокого покоя во всех клеточных линиях независимо от их *p53/PTEN* активности. Образование ощутимого количества медленно делящихся ПГОК/МГОК, находящихся в состоянии покоя происходило в клеточных линиях с *TAp53* (либо дикого (U87), либо мутированного (LN229), в отличие от клеток с *GFP53mut*, где наблюдались единичные такие клетки. Помимо этого, почти такая же популяция G^{Alert}

клеток находящихся в состоянии неглубокого покоя, включая ПГОК/МГОК, образовывалась только в высоко радиорезистентных U87 клетках с *TAp53wt*.

Независящий от прикрепления к субстрату рост опухолевых клеток является отличительной чертой их резистентности к разновидности апоптоза называемой аноикисом (по англ. anoikis), регулируемым адгезией к субстрату, и является первым шагом к метастазированию опухоли. Клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются плохо изученными. Чтобы определить, отличаются ли опухолевые клетки с различным генотипом и растентностью по способности к сохранению репродуктивной активности в качестве адаптационного ответа клеток линий ГБМ на стресс, индуцированный рентгеновским излучением, мы использовали анализ образования колоний в мягком агаре.

Наблюдаемые РЖ клетки, полученные из U87 клеток, могут происходить в результате отпочковывания от МГОК и/или асимметричного деления этих клеток. Было предположено, что эти новые клетки, образованные в результате неоза, могут быть ответственны за репопуляцию опухолевых клеток. Анализ образования колоний в мягком агаре показал почти 5-кратное увеличение эффективности колониеобразования после облучения клеток U87 в дозе 2 Гр (Рис. 3.13 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 не влияло (LN229) или 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. 3.13 Д).

Примечательно, что клетки U251 образовывали более плотные колонии по сравнению с клетками LN229 и U87 (Рис.3.13 Г). Большинство колоний,

полученных из U87, были диффузными с ореолом клеток, мигрирующих в агар, что указывает на наиболее высокую инвазивность клеток, составляющих колонию.

Интересно, что 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. 13 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 *TAp53wt* U87.

Следует отметить, что, как и в случае клеточных линий НМРЛ, облучение как U87, так и U251 клеток, лишь незначительно изменило 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 значимого влияния на экспрессию FRA1 в клетках LN229 (Рис. 3.14 Б). Поэтому мы предположили, что воздействие ИИ существенно не влияет на экспрессию FRA1 в облученных клетках линий ГБМ независимо от их *PTEN* активности. Эти результаты могут свидетельствовать о возможной роли другого транскрипционного фактора/ов, такого/их как Twist, Snail, Zeb-1/2, в поддержании радиорезистентности, клоногенной выживаемости и репопуляции опухолевых клеток, распространении и приобретении ЭМП-подобных фенотипов в клетках линий ГБМ человека после рентгеновского облучения. В качестве альтернативы видится исследование

фосфорилирования FRA1, которое является модификацией, необходимой для формирования комплекса FRA1-JunB.

Доминантно-негативные мутации (Gain-of-Function) в белке p53 (*GOF mut-p53*) недостаточно изучены в ГБМ. Большинство исследований p53 в ГБМ не смогли обнаружить различие между клетками с делециями в гене *TP53* и *GOF mut-p53*. Хорошо известно, что, в отличие от *p53wt*, *GOF p53mut* проявляет себя, взаимодействуя с различными факторами транскрипции (например, SREBP, VDR, Sp1, ETS2, NFR2, p73, p63), которые способствуют инициации и прогрессированию опухоли. Ген *PTEN* индуцируется *p53* 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 *TAp53/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. 15 А).

Следует отметить, что в клетках U87, содержащих *TAp53wt*, увеличение p63 было выше (3,4 - 2,5 раза в зависимости от дозы) по сравнению с клетками U251, несущими *GOF p53mut*, где увеличение составило только 1,2-1,4 раза. Напротив, облучение клеток LN229, несущих *PTENwt* и *TAp53mut*, значительно увеличило (>10 и > 2 раз) экспрессию белка p73 после облучения в дозе 2 и 4 Гр, соответственно (Рис. 3.15 Б). 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 *TAp53wt*

клеток к репопуляции (Рис. 3.13), тогда как подъем экспрессии p73 при наличии *PTEN^{wt}* снижает эту склонность не смотря на изначально повышенное образование МГОК клетками LN229 (Рис. 3.8). Нами было предположено, что дальнейшая судьба (выбор между апоптозом или спасительным преждевременным старением) подвергшихся облучению опухолевых клеток, включая предрасполагающие и вновь образованные МГОК, может определяться мутациям *PTEN* в клетках ГБМ.

Обнаружение того, что экспрессия p63/p73 значительно повышено в клетках линий ГБМ, вызвало наш интерес к ассоциации их экспрессии с развитием признаков ЭМП, способствующих миграции клеток ГБМ после воздействия ИИ. Виментин и N-кадгерин могут поддерживать клеточную целостность и участвовать в нескольких клеточных сигнальных путях, модулирующих подвижность и инвазию раковых клеток. До сих пор неясно, регулирует ли p53 непосредственно ген, кодирующий Кадгерин. Поэтому, мы оценили паттерны экспрессии белка E-кадгерина, N-кадгерина и виментина в качестве классических маркеров ЭМП в линиях клеток ГБМ человека, используя анализ с помощью вестерн-блоттинга.

Образование ПГОК/МГОК в клеточных популяциях линий клеток ГБМ сопровождалось изменениями экспрессии E- и N-кадгеринов и Виментина в ответ на различные дозы облучения (Рис. 16 Б, В, Г). В *PTEN*-дефицитных клеточных линиях облучение индуцировало смешанный (гибридный) фенотип ЭМП. В частности, только в наиболее радиорезистентных клетках U87 с *TAp53^{wt}/PTEN^{mut}* после облучения в дозе 6 Гр был обнаружен фенотип характерный для ЭМП – значительное снижение экспрессии эпителиального маркера E-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.

Облученные *GOF p53mut/PTENmut* U251 клетки экспрессировали значительно больше Виментина при значительном снижении экспрессии N-кадгерина. В присутствии *PTENwt* облученные клетки с *TAp53mut* (LN229) экспрессировали наименьшее количество всех 3 маркеров ЭМП, при чем любая из выбранных доз ИИ значительно снижала экспрессию обоих кадеринов (более чем в 63 и 3 раза для Е- и N-кадгерина соответственно) без статистически значимого влияния на экспрессию виментина в клетках с *TAp53mut* (LN229) (Рис. 16 А, Б и В).

Таким образом, отсутствие *PTEN* в *p53wt* клетках линии 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 фенотипа возможно давало этим клеткам преимущества в клоногенной выживаемости после облучения в дозах 2 - 4 Гр.

Клетка должна покинуть клеточный цикл, чтобы стать покоящейся (дормантной): либо спящей, либо стареющей. Наблюдаемая нами картина бифуркации окрашивания Ki67 (Рис. 3.11) может указывать на то, что вскоре после генотоксического стимула поврежденные клетки ГБМ покидают клеточный цикл. Мы предложили, что те клетки, которые успешно восстанавливаются после повреждения ДНК, снова входят в клеточный цикл, в то время как клетки с непоправимыми повреждениями старели. Стареющие клетки также либо не экспрессирующими, либо слабо экспрессирующими Ki67, имитируя клетки, находящиеся в состоянии полного покоя G0.

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 имеющих наиболее распространенный набор мутаций *TP53* 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. 3.17 Б), тогда как доля тех же клеток в линиях U251 и LN229 не изменялась (Рис. 3.17 А и В).

Важно отметить, что, в отсутствие *PTEN*, облучение в дозе 2 Гр вызывала статистически значимое 2-кратное увеличение доли SA- β -Gal+ МГОК только в p53wt линии U87, демонстрируя лишь тренд к увеличению той же фракции в *GOF TAp53mut* клетках U251. При этом, при наличии *PTENwt*, только облучение в дозе 4 Гр лишь незначительно увеличивало фракцию SA- β -Gal+ МГОК в *TAp53mut* LN229 клетках.

Подводя итог, полученные нами данные позволили предположить, что значительное увеличение экспрессии p63 в опухолевых клетках, приобретение ими гибридного 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 линий ГБМ и степенью

стресс-индуцированного преждевременного старения (SIPS) (SA- β -Gal+/Ki67^{low}), которое, вероятно, более значительно стимулируется именно в *TAp53wt*, а не в *GOF TAp53mut* клетках ГБМ.

Результаты наших исследований имеют также и важное методологическое значение относительно источников и путей преодоления возможных артефактов при определении радиочувствительности опухолевых клеток. Традиционный клоногенный анализ (ТКА) клеточной радиочувствительности включает оценку числа выживших прикрепленных к пластику колоний клеток. Согласно результатам ТКА клетки H1299DE (Рис.3.1.В), облученные в режиме FDE, следовало признать радиочувствительными, но радиорезистентными по результатам оценки клоногенного выживания в мягком агаре (Рис. 3.2.Б). При таком же режиме клетки *p53wt* A549DE продемонстрировали явную радиорезистентность в колониях в мягком агаре (условия, не зависящие от субстрата), хотя те же самые клетки, выращенные на пластике, почти не показали различий в радиочувствительности по сравнению с родительскими клетками. Интересно, что облучение в режиме SF вызывало увеличение радиорезистентности клеток A549S в тесте ТКА, но не в мягком агаре. Напротив, тот же режим повышал радиорезистентность клеток H1299S в мягком агаре, не влияя на их радиочувствительность, оцениваемую с помощью ТКА. Таким образом, следует относиться с осторожностью к данным, полученным при определении клеточной радиорезистентности с помощью метода оценки эффективности адгезионного роста клеток (анкоридж-зависимого роста клеток) и метода оценки способности клеток к репопуляции после облучения (независимого от адгезии роста клеток в мягком агаре), с учетом возможной модуляции адгезионных свойств клеток (за счет приобретения характеристик ЭМП, см. выше) и сути анализа. Что касается последнего пункта, рост клеток, независимый от прикрепления к пластику

является наиболее точным тестом *in vitro* для индикации злокачественной трансформации клеток и туморогенеза. В этом отношении наши данные подчеркивают, что оба режима фракционированного облучения вызывали в целом более высокую дозозависимое увеличение злокачественности клеток *p53null* H1299DE и H1299S, в сравнении с родительскими клетками H1299. Более того, наши результаты показывают, что режим FDE повышает радиорезистентность выживших после фракционированного облучения клеток НМРЛ независимо от наличия функционально-активного *p53*, тогда как режим SF продемонстрировал аналогичный эффект только для *p53null* клеток НМРЛ.

Во время ЛТ лечебная доза ИИ, фракционирование и пределы доз для OAR часто не персонифицируются и по-прежнему назначаются в основном в зависимости от стадии опухоли, состояния лимфоузлов, метастазов, сопутствующих заболеваний, но без учета биологии опухоли того или иного конкретного пациента. Воздействие фракционированного облучения часто приводит к выживанию опухолевых клеток с приобретенной радиорезистентностью. Нами было показано, что два режима фракционированного облучения по-разному влияют на радиочувствительность выживших клеток линий НМРЛ, отличающихся по наличию в них гена *TAp53*.

Первоначально стандартная ЛТ была разработана для ограничения тканевой токсичности органов риска (organ at risk (OAR)). Недавние преимущества в методах визуализации позволили разработать технологии ЛТ с повышенной точностью определения объема мишени, например ЛТ с модуляцией интенсивности (IMRT). IMRT позволяет создать поле излучения необходимого размера и формы для облучения отдельных объемов опухоли с различной интенсивностью в течение одного сеанса [365], потенциально

снижая тканевую токсичность при увеличении дозы на опухоль [366]. ЛТ в режиме гипофракционирования с использованием передовых методов визуализации и технологических подходов может повысить вероятность контроля над опухолью и снизить тканевую токсичность [367]. Внедрение передовых технологий ЛТ, таких как трехмерная (3D) конформная стереотаксическая ЛТ (СЛТ) с использованием компьютерной томографии, позволило улучшить охват опухоли и снизить дозу OAR [368]. Использование СЛТ при раке легких на ранней стадии привело к тому, что частота местного контроля составила до 90%, что превосходит контрольные показатели традиционной ЛТ [369, 370]. Доставка более высокой дозы к целевому объему и минимизация повреждения окружающих нормальных тканей СЛТ стала успешной. Бустерные дозы включали либо умеренное гипофракционирование 2 - 4 Гр, либо СЛТ на основе экстремального гипофракционирования. Улучшенный результат СЛТ по сравнению с традиционной ЛТ включает дифференциальное уничтожение эндотелиальных клеток и ОСК, преодоление радиорезистентности ОСК, вызванной гипоксией, активацию сложных иммунологических путей и эффекты свидетеля/абскопальные опухолевидные эффекты, приводящие к лучшим результатам лечения [367]. С терапевтической точки зрения наше исследование *in vitro* может помочь в выборе наиболее эффективного режима фракционированного облучения путем анализа уровня экспрессии белков семейства p53 в опухолях и максимизации терапевтических преимуществ для пациентов с минимальным повреждением коллатеральных тканей. Это также может быть полезным для изменения доз и режима фракционирования, чтобы улучшить местный контроль и результаты при местно-распространенных заболеваниях.

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*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ATM	(англ. ataxia telangiectasia mutated) — серин/треониновая протеинкиназа, мутация по которой вызывает заболевание - атаксия телеангиэктазия
BSA	Бычий сывороточный альбумин
CCL	Хемокиновый (мотив CC) лиганд
CD	Кластер дифференцировки
DDR	Реакция на повреждение ДНК
EdU	5-этинил-2'-дезоксисуридин
EGFR	Рецептор эпидермального фактора роста
EpCAM	Молекула клеточной адгезии эпителия
FBS	Фетальная бычья сыворотка крупного рогатого скота
FDE	Fraction Dose Escalation (фракционное увеличение дозы)
FGF	Фактор роста фибробластов
FOXC2	Forkhead коробки белка C2
FRA1	FOS-родственный антиген-1
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GOF	Gain-of-function (усиление функции)
HGF	Фактор роста гепатоцитов
HRR	Homologous recombination repair (гомологичная рекомбинация)
IL	Интерлейкин
MDSC	Супрессорные клетки миелоидного происхождения
MMP	Матриксные металлопротеиназы
mTOR	Мишень рапамицина у млекопитающих
MTT	Бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенилтетразолия
L1CAM	Молекула адгезии клеток L1

NF-κB	Ядерный фактор каппа-би
NHEJ	Non-homologous end joining (негомологичное соединение концов)
PBS	Фосфатный буферный солевой раствор
PFA	Параформальдегид
RIPA	Буфер для анализа радио радио-иммунопреципитации
SASP	Ассоциированный со старением секреторный фенотип
SA-β-Gal	Ассоциированная со старением бета-галактозидаза
SDF-1	Стромальный фактор роста-1
SF	Standard fractionation (стандартное фракционирование)
SIPS	Stress-induced premature senescence (стресс-индуцированное преждевременное старение)
TAN	Опухоль-ассоциированные нейтрофилы
TGF-β	Трансформирующий фактор роста бета
TNC	Тенаскины -С
TNF-α	Фактор некроза опухоли-альфа
VEGF	Фактор роста сосудистого эндотелия
АФК	Активные формы кислорода
Гр	Грей
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДР	Двунитевой Двунитевые разрывы
ИИ	Ионизирующее излучение
M-CSF	Макрофагальный колониестимулирующий фактор
ОСК	Опухолевые стволовые клетки
СЛТ	Стереотаксическая лучевая терапия
ТА	Транскрипционно активный
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstraw P., Ball D., Jett J. R., Le Chevalier T., Lim E., Nicholson A. G., Shepherd F. A. Non-small-cell lung cancer // *Lancet*. – 2011. – Т. 378, № 9804. – С. 1727-40.
2. Parsons A., Daley A., Begh R., Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis // *BMJ*. – 2010. – Т. 340. – С. b5569.
3. Ostrom Q. T., Gittleman H., Liao P., Rouse C., Chen Y., Dowling J., Wolinsky Y., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011 // *Neuro Oncol*. – 2014. – Т. 16 Suppl 4. – С. iv1-63.
4. Gilbert M. R., Dignam J. J., Armstrong T. S., Wefel J. S., Blumenthal D. T., Vogelbaum M. A., Colman H., Chakravarti A., Pugh S., Won M., Jeraj R., Brown P. D., Jaeckle K. A., Schiff D., Stieber V. W., Brachman D. G., Werner-Wasik M., Tremont-Lukats I. W., Sulman E. P., Aldape K. D., Curran W. J., Jr., Mehta M. P. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma // *N Engl J Med*. – 2014. – Т. 370, № 8. – С. 699-708.
5. Kaskowitz L., Graham M. V., Emami B., Halverson K. J., Rush C. Radiation therapy alone for stage I non-small cell lung cancer // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 1993. – Т. 27, № 3. – С. 517-23.
6. Kazmi F., Soon Y. Y., Leong Y. H., Koh W. Y., Vellayappan B. Re-irradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis // *J Neurooncol*. – 2019. – Т. 142, № 1. – С. 79-90.
7. Рябая О. О., Прокофьева А. А., Хоченков Д. А., Акасов Р. А., Буров С. В., Марквичева Е. А., Степанова Е. В. Роль эпителиально-мезенхимального перехода и аутофагии в противоопухолевом ответе клеточных линий

меланомы на таргетное ингибирование MEK и mTOR киназ // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18, № 3. – С. 54-63.

8. Inda M. M., Bonavia R., Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature // *Cancers (Basel)*. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 226-39.

9. Замулаева И., Матчук О., Селиванова Е., Андреев В., Липунов Н., Макаренко С., Жаворонков Л., Саенко А. Увеличение количества опухолевых стволовых клеток под воздействием редкоионизирующего излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2014. – Т. 54, № 3. – С. 256-264.

10. Lathia J. D., Mack S. C., Mulkearns-Hubert E. E., Valentim C. L., Rich J. N. Cancer stem cells in glioblastoma // *Genes Dev*. – 2015. – Т. 29, № 12. – С. 1203-17.

11. Young J. E., Boulanger-Weill J., Williams D. A., Woodruff G., Buen F., Revilla A. C., Herrera C., Israel M. A., Yuan S. H., Edland S. D., Goldstein L. S. Elucidating molecular phenotypes caused by the SORL1 Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Т. 16, № 4. – С. 373-85.

12. Tabatabai G., Weller M. Glioblastoma stem cells // *Cell Tissue Res*. – 2011. – Т. 343, № 3. – С. 459-65.

13. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. / Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster J. C.: Elsevier health sciences, 2014.

14. Zhang L., Ding P., Lv H., Zhang D., Liu G., Yang Z., Li Y., Liu J., Zhang S. Number of polyploid giant cancer cells and expression of EZH2 are associated with VM formation and tumor grade in human ovarian tumor // *Biomed Res Int*. – 2014. – Т. 2014. – С. 903542.

15. Zhang S., Mercado-Uribe I., Hanash S., Liu J. iTRAQ-based proteomic analysis of polyploid giant cancer cells and budding progeny cells reveals several distinct

pathways for ovarian cancer development // PLoS One. – 2013. – T. 8, № 11. – C. e80120.

16. Moore S., Leung B., Wu J., Ho C. Population-based analysis of curative therapies in stage II non-small cell lung cancer: the role of radiotherapy in medically inoperable patients // Radiat Oncol. – 2020. – T. 15, № 1. – C. 23.

17. Moeller B., Balagamwala E. H., Chen A., Creach K. M., Giaccone G., Koshy M., Zaky S., Rodrigues G. Palliative thoracic radiation therapy for non-small cell lung cancer: 2018 Update of an American Society for Radiation Oncology (ASTRO) Evidence-Based Guideline // Pract Radiat Oncol. – 2018. – T. 8, № 4. – C. 245-250.

18. Baker S., Dahele M., Lagerwaard F. J., Senan S. A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer // Radiat Oncol. – 2016. – T. 11, № 1. – C. 115.

19. Andersen B. L., Goyal N. G., Weiss D. M., Westbrook T. D., Maddocks K. J., Byrd J. C., Johnson A. J. Cells, cytokines, chemokines, and cancer stress: A biobehavioral study of patients with chronic lymphocytic leukemia // Cancer. – 2018. – T. 124, № 15. – C. 3240-3248.

20. Falkson C. B., Vella E. T., Yu E., El-Mallah M., Mackenzie R., Ellis P. M., Ung Y. C. Radiotherapy With Curative Intent in Patients With Early-stage, Medically Inoperable, Non-Small-cell Lung Cancer: A Systematic Review // Clin Lung Cancer. – 2017. – T. 18, № 2. – C. 105-121 e5.

21. Perez C. A., Pajak T. F., Rubin P., Simpson J. R., Mohiuddin M., Brady L. W., Perez-Tamayo R., Rotman M. Long-term observations of the patterns of failure in patients with unresectable non-oat cell carcinoma of the lung treated with definitive radiotherapy. Report by the Radiation Therapy Oncology Group // Cancer. – 1987. – T. 59, № 11. – C. 1874-81.

22. McDonald F., Popat S. Combining targeted agents and hypo- and hyper-fractionated radiotherapy in NSCLC // *J Thorac Dis.* – 2014. – T. 6, № 4. – C. 356-68.
23. Rycaj K., Tang D. G. Cancer stem cells and radioresistance // *Int J Radiat Biol.* – 2014. – T. 90, № 8. – C. 615-21.
24. Zaider M., Hanin L. Tumor control probability in radiation treatment // *Med Phys.* – 2011. – T. 38, № 2. – C. 574-83.
25. McDermott N., Meunier A., Mooney B., Nortey G., Hernandez C., Hurley S., Lynam-Lennon N., Barsoom S. H., Bowman K. J., Marples B., Jones G. D., Marignol L. Fractionated radiation exposure amplifies the radioresistant nature of prostate cancer cells // *Sci Rep.* – 2016. – T. 6. – C. 34796.
26. Milano M. T., Kong F. S., Movsas B. Stereotactic body radiotherapy as salvage treatment for recurrence of non-small cell lung cancer after prior surgery or radiotherapy // *Transl Lung Cancer Res.* – 2019. – T. 8, № 1. – C. 78-87.
27. Prezzano K. M., Ma S. J., Hermann G. M., Rivers C. I., Gomez-Suescun J. A., Singh A. K. Stereotactic body radiation therapy for non-small cell lung cancer: A review // *World J Clin Oncol.* – 2019. – T. 10, № 1. – C. 14-27.
28. Donovan E. K., Swaminath A. Stereotactic body radiation therapy (SBRT) in the management of non-small-cell lung cancer: Clinical impact and patient perspectives // *Lung Cancer (Auckl).* – 2018. – T. 9. – C. 13-23.
29. Bradley J. D., El Naqa I., Drzymala R. E., Trovo M., Jones G., Denning M. D. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small-cell lung cancer: the pattern of failure is distant // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2010. – T. 77, № 4. – C. 1146-50.
30. Kennedy W. R., Gabani P., Nikitas J., Robinson C. G., Bradley J. D., Roach M. C. Repeat stereotactic body radiation therapy (SBRT) for salvage of isolated local

recurrence after definitive lung SBRT // *Radiother Oncol.* – 2020. – T. 142. – C. 230-235.

31. Desai A., Webb B., Gerson S. L. CD133+ cells contribute to radioresistance via altered regulation of DNA repair genes in human lung cancer cells // *Radiother Oncol.* – 2014. – T. 110, № 3. – C. 538-45.

32. Lin S. Q., Jia F. J., Zhang C. Y., Liu F. Y., Ma J. H., Han Z., Xie W. D., Li X. Actinomycin V Suppresses Human Non-Small-Cell Lung Carcinoma A549 Cells by Inducing G2/M Phase Arrest and Apoptosis via the p53-Dependent Pathway // *Mar Drugs.* – 2019. – T. 17, № 10.

33. Zhang H. Y., Gu Y. Y., Li Z. G., Jia Y. H., Yuan L., Li S. Y., An G. S., Ni J. H., Jia H. T. Exposure of human lung cancer cells to 8-chloro-adenosine induces G2/M arrest and mitotic catastrophe // *Neoplasia.* – 2004. – T. 6, № 6. – C. 802-12.

34. Fernandez-Aroca D. M., Roche O., Sabater S., Pascual-Serra R., Ortega-Muelas M., Sanchez Perez I., Belandia B., Ruiz-Hidalgo M. J., Sanchez-Prieto R. P53 pathway is a major determinant in the radiosensitizing effect of Palbociclib: Implication in cancer therapy // *Cancer Lett.* – 2019. – T. 451. – C. 23-33.

35. Jeon H. Y., Kim J. K., Ham S. W., Oh S. Y., Kim J., Park J. B., Lee J. Y., Kim S. C., Kim H. Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype // *Tumour Biol.* – 2016. – T. 37, № 5. – C. 5857-67.

36. Brandes A. A. State-of-the-art treatment of high-grade brain tumors // *Semin Oncol.* – 2003. – T. 30, № 6 Suppl 19. – C. 4-9.

37. Brandes A. A., Tosoni A., Franceschi E., Reni M., Gatta G., Vecht C. Glioblastoma in adults // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2008. – T. 67, № 2. – C. 139-52.

38. Verdecchia A., Francisci S., Brenner H., Gatta G., Micheli A., Mangone L., Kunkler I., Group E.-W. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data // *Lancet Oncol.* – 2007. – T. 8, № 9. – C. 784-96.

39. Jung V., Romeike B. F., Henn W., Feiden W., Moringlane J. R., Zang K. D., Urbschat S. Evidence of focal genetic microheterogeneity in glioblastoma multiforme by area-specific CGH on microdissected tumor cells // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 1999. – Т. 58, № 9. – С. 993-9.
40. Parkin D., Whelan S., Ferlay J., Teppo L., Thomas D. Cancer incidence in five continents Volume VIII // IARC scientific publication. – 2002. № 155.
41. Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P. L., Burkhard C., Schuler D., Probst-Hensch N. M., Maiorka P. C., Baeza N., Pisani P., Yonekawa Y., Yasargil M. G., Lutolf U. M., Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study // *Cancer Res.* – 2004. – Т. 64, № 19. – С. 6892-9.
42. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways // *Nature.* – 2008. – Т. 455, № 7216. – С. 1061-8.
43. Bello M. J., de Campos J. M., Kusak M. E., Vaquero J., Sarasa J. L., Pestana A., Rey J. A. Molecular analysis of genomic abnormalities in human gliomas // *Cancer Genet Cytogenet.* – 1994. – Т. 73, № 2. – С. 122-9.
44. Kleihues P., Louis D. N., Scheithauer B. W., Rorke L. B., Reifenberger G., Burger P. C., Cavenee W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2002. – Т. 61, № 3. – С. 215-25; discussion 226-9.
45. Макушева Ю., Дианов Г. Репарация ДНК в опухолевых стволовых клетках как фактор развития устойчивости глиом к радиотерапии // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2015. – Т. 19, № 3. – С. 247-254.
46. Louis D. N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W. K., Ohgaki H., Wiestler O. D., Kleihues P., Ellison D. W. The 2016

World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary // *Acta Neuropathol.* – 2016. – T. 131, № 6. – C. 803-20.

47. Wild-Bode C., Weller M., Rimmer A., Dichgans J., Wick W. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma // *Cancer Res.* – 2001. – T. 61, № 6. – C. 2744-50.

48. Ignatova T. N., Kukekov V. G., Laywell E. D., Suslov O. N., Vrionis F. D., Steindler D. A. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro // *Glia.* – 2002. – T. 39, № 3. – C. 193-206.

49. Hemmati H. D., Nakano I., Lazareff J. A., Masterman-Smith M., Geschwind D. H., Bronner-Fraser M., Kornblum H. I. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – T. 100, № 25. – C. 15178-83.

50. Galli R., Binda E., Orfanelli U., Cipelletti B., Gritti A., De Vitis S., Fiocco R., Foroni C., Dimeco F., Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma // *Cancer Res.* – 2004. – T. 64, № 19. – C. 7011-21.

51. Brazel C. Y., Limke T. L., Osborne J. K., Miura T., Cai J., Pevny L., Rao M. S. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain // *Aging Cell.* – 2005. – T. 4, № 4. – C. 197-207.

52. Walker M. D., Strike T. A., Sheline G. E. An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 1979. – T. 5, № 10. – C. 1725-31.

53. Brada M. Current approaches to radiation therapy for malignant gliomas // *Front Radiat Ther Oncol.* – 1999. – T. 33. – C. 139-49.

54. Keime-Guibert F., Chinot O., Taillandier L., Cartalat-Carel S., Frenay M., Kantor G., Guillozo J. S., Jadaud E., Colin P., Bondiau P. Y., Menei P., Loiseau H., Bernier V., Honnorat J., Barrie M., Mokhtari K., Mazon J. J., Bissery A., Delattre

- J. Y., Association of French-Speaking N.-O. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly // *N Engl J Med.* – 2007. – T. 356, № 15. – C. 1527-35.
55. Roa W., Brasher P. M., Bauman G., Anthes M., Bruera E., Chan A., Fisher B., Fulton D., Gulavita S., Hao C., Husain S., Murtha A., Petruk K., Stewart D., Tai P., Urtasun R., Cairncross J. G., Forsyth P. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial // *J Clin Oncol.* – 2004. – T. 22, № 9. – C. 1583-8.
56. Tsao M. N., Lloyd N. S., Wong R. K., Rakovitch E., Chow E., Laperriere N., Supportive Care Guidelines Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based C. Radiotherapeutic management of brain metastases: a systematic review and meta-analysis // *Cancer Treat Rev.* – 2005. – T. 31, № 4. – C. 256-73.
57. Kleinberg L., Grossman S. A., Piantadosi S., Pearlman J., Engelhard H., Lesser G., Ruffer J., Gerber M. Phase I trial to determine the safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of RSR13, a novel radioenhancer, in newly diagnosed glioblastoma multiforme // *J Clin Oncol.* – 1999. – T. 17, № 8. – C. 2593-603.
58. Eyler C. E., Rich J. N. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis // *J Clin Oncol.* – 2008. – T. 26, № 17. – C. 2839-45.
59. Kaya A., Ciledag A., Gulbay B. E., Poyraz B. M., Celik G., Sen E., Savas H., Savas I. The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients // *Respir Med.* – 2004. – T. 98, № 7. – C. 632-6.
60. Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye A. H. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma // *J Clin Neurosci.* – 2015. – T. 22, № 8. – C. 1219-26.
61. Fujiwara T., Bandi M., Nitta M., Ivanova E. V., Bronson R. T., Pellman D. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells // *Nature.* – 2005. – T. 437, № 7061. – C. 1043-7.

62. Snijder B., Pelkmans L. Origins of regulated cell-to-cell variability // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2011. – T. 12, № 2. – C. 119-25.
63. Inda M. M., Bonavia R., Mukasa A., Narita Y., Sah D. W., Vandenberg S., Brennan C., Johns T. G., Bachoo R., Hadwiger P., Tan P., Depinho R. A., Cavenee W., Furnari F. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma // *Genes Dev.* – 2010. – T. 24, № 16. – C. 1731-45.
64. Heppner G. H. Tumor heterogeneity // *Cancer Res.* – 1984. – T. 44, № 6. – C. 2259-65.
65. McQuerry J. A., Chang J. T., Bowtell D. D. L., Cohen A., Bild A. H. Mechanisms and clinical implications of tumor heterogeneity and convergence on recurrent phenotypes // *J Mol Med (Berl).* – 2017. – T. 95, № 11. – C. 1167-1178.
66. Visvader J. E. Cells of origin in cancer // *Nature.* – 2011. – T. 469, № 7330. – C. 314-22.
67. Lim Z. F., Ma P. C. Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy // *J Hematol Oncol.* – 2019. – T. 12, № 1. – C. 134.
68. Lovly C. M., Salama A. K., Salgia R. Tumor Heterogeneity and Therapeutic Resistance // *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* – 2016. – T. 35. – C. e585-93.
69. Rich J. N. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity // *Medicine (Baltimore).* – 2016. – T. 95, № 1 Suppl 1. – C. S2-S7.
70. Puhr M., Hoefler J., Schafer G., Erb H. H., Oh S. J., Klocker H., Heidegger I., Neuwirt H., Culig Z. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205 // *Am J Pathol.* – 2012. – T. 181, № 6. – C. 2188-201.
71. Eramo A., Lotti F., Sette G., Pillozzi E., Biffoni M., Di Virgilio A., Conticello C., Ruco L., Peschle C., De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic

- lung cancer stem cell population // *Cell Death Differ.* – 2008. – Т. 15, № 3. – С. 504-14.
72. Kendall S. E., Najbauer J., Johnston H. F., Metz M. Z., Li S., Bowers M., Garcia E., Kim S. U., Barish M. E., Aboody K. S., Glackin C. A. Neural stem cell targeting of glioma is dependent on phosphoinositide 3-kinase signaling // *Stem Cells.* – 2008. – Т. 26, № 6. – С. 1575-86.
73. Hamburger A. W., Salmon S. E. Primary bioassay of human tumor stem cells // *Science.* – 1977. – Т. 197, № 4302. – С. 461-3.
74. Han J., Won M., Kim J. H., Jung E., Min K., Jangili P., Kim J. S. Cancer stem cell-targeted bio-imaging and chemotherapeutic perspective // *Chem Soc Rev.* – 2020. – Т. 49, № 22. – С. 7856-7878.
75. Алкон Н., Иванова А., Фролова Е., Чумаков С. Раковые стволовые клетки как терапевтические мишени // *Гены и клетки.* – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 25-34.
76. Clarke M. F., Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve // *Cell.* – 2006. – Т. 124, № 6. – С. 1111-5.
77. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature.* – 2001. – Т. 414, № 6859. – С. 105-11.
78. Liu Y., Yang M., Luo J., Zhou H. Radiotherapy targeting cancer stem cells "awakens" them to induce tumour relapse and metastasis in oral cancer // *Int J Oral Sci.* – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 19.
79. Chang L., Graham P., Hao J., Ni J., Deng J., Bucci J., Malouf D., Gillatt D., Li Y. Cancer stem cells and signaling pathways in radioresistance // *Oncotarget.* – 2016. – Т. 7, № 10. – С. 11002-17.
80. Mirantes C., Espinosa I., Ferrer I., Dolcet X., Prat J., Matias-Guiu X. Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer // *Hum Pathol.* – 2013. – Т. 44, № 10. – С. 1973-81.

81. Puchinskaya M. V. [Cancer stem cell markers and their prognostic value] // *Arkhi Patol.* – 2016. – T. 78, № 2. – C. 47-54.
82. Kong Y., Yoshida S., Saito Y., Doi T., Nagatoshi Y., Fukata M., Saito N., Yang S. M., Iwamoto C., Okamura J., Liu K. Y., Huang X. J., Lu D. P., Shultz L. D., Harada M., Ishikawa F. CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL // *Leukemia.* – 2008. – T. 22, № 6. – C. 1207-13.
83. Singh S. K., Clarke I. D., Terasaki M., Bonn V. E., Hawkins C., Squire J., Dirks P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res.* – 2003. – T. 63, № 18. – C. 5821-8.
84. Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M. A., Daidone M. G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties // *Cancer Res.* – 2005. – T. 65, № 13. – C. 5506-11.
85. Collins A. T., Berry P. A., Hyde C., Stower M. J., Maitland N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells // *Cancer Res.* – 2005. – T. 65, № 23. – C. 10946-51.
86. Ricci-Vitiani L., Lombardi D. G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // *Nature.* – 2007. – T. 445, № 7123. – C. 111-5.
87. Hirschmann-Jax C., Foster A. E., Wulf G. G., Nuchtern J. G., Jax T. W., Gobel U., Goodell M. A., Brenner M. K. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – T. 101, № 39. – C. 14228-33.
88. Jiang F., Qiu Q., Khanna A., Todd N. W., Deepak J., Xing L., Wang H., Liu Z., Su Y., Stass S. A., Katz R. L. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-

- associated marker in lung cancer // *Mol Cancer Res.* – 2009. – T. 7, № 3. – C. 330-8.
89. Tirino V., Camerlingo R., Franco R., Malanga D., La Rocca A., Viglietto G., Rocco G., Pirozzi G. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer // *Eur J Cardiothorac Surg.* – 2009. – T. 36, № 3. – C. 446-53.
90. Huang Z., Cheng L., Guryanova O. A., Wu Q., Bao S. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting // *Protein Cell.* – 2010. – T. 1, № 7. – C. 638-55.
91. Gilbert C. A., Ross A. H. Glioma stem cells: cell culture, markers and targets for new combination therapies // *Cancer stem cells theories and practice.* – 2011.
92. Cole M. F., Johnstone S. E., Newman J. J., Kagey M. H., Young R. A. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells // *Genes Dev.* – 2008. – T. 22, № 6. – C. 746-55.
93. Hu Q., Zhang L., Wen J., Wang S., Li M., Feng R., Yang X., Li L. The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells // *Stem Cells.* – 2010. – T. 28, № 2. – C. 279-86.
94. Ikushima H., Todo T., Ino Y., Takahashi M., Miyazawa K., Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors // *Cell Stem Cell.* – 2009. – T. 5, № 5. – C. 504-14.
95. Marson A., Foreman R., Chevalier B., Bilodeau S., Kahn M., Young R. A., Jaenisch R. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency // *Cell Stem Cell.* – 2008. – T. 3, № 2. – C. 132-5.
96. Po A., Ferretti E., Miele E., De Smaele E., Paganelli A., Canettieri G., Coni S., Di Marcotullio L., Biffoni M., Massimi L., Di Rocco C., Screpanti I., Gulino A.

Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog // *EMBO J.* – 2010. – Т. 29, № 15. – С. 2646-58.

97. Song I. S., Jeong Y. J., Han J. Mitochondrial metabolism in cancer stem cells: a therapeutic target for colon cancer // *BMB Rep.* – 2015. – Т. 48, № 10. – С. 539-40.

98. Johannessen T. C., Bjerkvig R., Tysnes B. B. DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? // *Cancer Treat Rev.* – 2008. – Т. 34, № 6. – С. 558-67.

99. Al-Hajj M., Becker M. W., Wicha M., Weissman I., Clarke M. F. Therapeutic implications of cancer stem cells // *Curr Opin Genet Dev.* – 2004. – Т. 14, № 1. – С. 43-7.

100. Lee S. Y., Jeong E. K., Ju M. K., Jeon H. M., Kim M. Y., Kim C. H., Park H. G., Han S. I., Kang H. S. Induction of metastasis, cancer stem cell phenotype, and oncogenic metabolism in cancer cells by ionizing radiation // *Mol Cancer.* – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 10.

101. Никифорова З., Кудрявцев И., Арноцкая Н., Брюховецкий И., Шевченко В. Опухолевые стволовые клетки мультиформной глиобластомы // *Успехи молекулярной онкологии.* – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 26-33.

102. Oskarsson T., Batlle E., Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways // *Cell Stem Cell.* – 2014. – Т. 14, № 3. – С. 306-21.

103. Ye J., Wu D., Wu P., Chen Z., Huang J. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment // *Tumour Biol.* – 2014. – Т. 35, № 5. – С. 3945-51.

104. Plaks V., Kong N., Werb Z. The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? // *Cell Stem Cell.* – 2015. – Т. 16, № 3. – С. 225-38.

105. Поздняков Д., Шувалов О., Барлев Н., Миттенберг А. Транскрипционный фактор Zeb1: посттранскрипционная регуляция его активности в карциномах молочной железы человека // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 1. – С. 3-15.
106. Mani S. A., Guo W., Liao M. J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., Campbell L. L., Polyak K., Briskin C., Yang J., Weinberg R. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // Cell. – 2008. – Т. 133, № 4. – С. 704-15.
107. Kotiyal S., Bhattacharya S. Breast cancer stem cells, EMT and therapeutic targets // Biochem Biophys Res Commun. – 2014. – Т. 453, № 1. – С. 112-6.
108. Dezso Z., Oestreicher J., Weaver A., Santiago S., Agoulnik S., Chow J., Oda Y., Funahashi Y. Gene expression profiling reveals epithelial mesenchymal transition (EMT) genes can selectively differentiate eribulin sensitive breast cancer cells // PLoS One. – 2014. – Т. 9, № 8. – С. e106131.
109. Kalluri R., Weinberg R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // J Clin Invest. – 2009. – Т. 119, № 6. – С. 1420-8.
110. Caramel J., Papadogeorgakis E., Hill L., Browne G. J., Richard G., Wierinckx A., Saldanha G., Osborne J., Hutchinson P., Tse G., Lachuer J., Puisieux A., Pringle J. H., Ansieau S., Tulchinsky E. A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma // Cancer Cell. – 2013. – Т. 24, № 4. – С. 466-80.
111. Byers L. A., Diao L., Wang J., Saintigny P., Girard L., Peyton M., Shen L., Fan Y., Giri U., Tumula P. K., Nilsson M. B., Gudikote J., Tran H., Cardnell R. J., Bearss D. J., Warner S. L., Foulks J. M., Kanner S. B., Gandhi V., Krett N., Rosen S. T., Kim E. S., Herbst R. S., Blumenschein G. R., Lee J. J., Lippman S. M., Ang K. K., Mills G. B., Hong W. K., Weinstein J. N., Wistuba, II, Coombes K. R., Minna J. D., Heymach J. V. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for

overcoming EGFR inhibitor resistance // *Clin Cancer Res.* – 2013. – T. 19, № 1. – C. 279-90.

112. Takebe N., Miele L., Harris P. J., Jeong W., Bando H., Kahn M., Yang S. X., Ivy S. P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2015. – T. 12, № 8. – C. 445-64.

113. Arumugam T., Ramachandran V., Fournier K. F., Wang H., Marquis L., Abbruzzese J. L., Gallick G. E., Logsdon C. D., McConkey D. J., Choi W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer // *Cancer Res.* – 2009. – T. 69, № 14. – C. 5820-8.

114. Gonzalez-Moreno O., Lecanda J., Green J. E., Segura V., Catena R., Serrano D., Calvo A. VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop // *Exp Cell Res.* – 2010. – T. 316, № 4. – C. 554-67.

115. Khromova N., Kopnin P., Rybko V., Kopnin B. P. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms // *Oncogene.* – 2012. – T. 31, № 11. – C. 1389-97.

116. Yi Z. Y., Feng L. J., Xiang Z., Yao H. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells // *J Invest Surg.* – 2011. – T. 24, № 2. – C. 67-76.

117. Brabletz T., Hlubek F., Spaderna S., Schmalhofer O., Hiendlmeyer E., Jung A., Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin // *Cells Tissues Organs.* – 2005. – T. 179, № 1-2. – C. 56-65.

118. Ortensi B., Setti M., Osti D., Pelicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness // *Stem Cell Res Ther.* – 2013. – T. 4, № 1. – C. 18.

119. Heldin C. H., Landstrom M., Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition // *Curr Opin Cell Biol.* – 2009. – Т. 21, № 2. – С. 166-76.
120. Mallini P., Lennard T., Kirby J., Meeson A. Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance // *Cancer Treat Rev.* – 2014. – Т. 40, № 3. – С. 341-8.
121. Фармаковская М., Хромова Н., Рыбко В., Копнин П. Б. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в регуляции свойств раковых стволовых клеток солидных опухолей // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2015. – Т. 14, № 4. – С. 3-8.
122. Kurrey N. K., Jalgaonkar S. P., Joglekar A. V., Ghanate A. D., Chaskar P. D., Doiphode R. Y., Vapat S. A. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells // *Stem Cells.* – 2009. – Т. 27, № 9. – С. 2059-68.
123. Zhang X., Wu J., Luo S., Lechler T., Zhang J. Y. FRA1 promotes squamous cell carcinoma growth and metastasis through distinct AKT and c-Jun dependent mechanisms // *Oncotarget.* – 2016. – Т. 7, № 23. – С. 34371-83.
124. Diesch J., Sanij E., Gilan O., Love C., Tran H., Fleming N. I., Ellul J., Amalia M., Haviv I., Pearson R. B., Tulchinsky E., Mariadason J. M., Sieber O. M., Hannan R. D., Dhillon A. S. Widespread FRA1-dependent control of mesenchymal transdifferentiation programs in colorectal cancer cells // *PLoS One.* – 2014. – Т. 9, № 3. – С. e88950.
125. Zhang L., Liu H., Mu X., Cui J., Peng Z. Dysregulation of Fra1 expression by Wnt/beta-catenin signalling promotes glioma aggressiveness through epithelial-mesenchymal transition // *Biosci Rep.* – 2017. – Т. 37, № 2.
126. Risolino M., Mandia N., Iavarone F., Dardaei L., Longobardi E., Fernandez S., Talotta F., Bianchi F., Pisati F., Spaggiari L., Harter P. N., Mittelbronn M., Schulte

D., Incoronato M., Di Fiore P. P., Blasi F., Verde P. Transcription factor PREP1 induces EMT and metastasis by controlling the TGF-beta-SMAD3 pathway in non-small cell lung adenocarcinoma // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – T. 111, № 36. – C. E3775-84.

127. Usui A., Hoshino I., Akutsu Y., Sakata H., Nishimori T., Murakami K., Kano M., Shuto K., Matsubara H. The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma // *Cancer.* – 2012. – T. 118, № 13. – C. 3387-96.

128. Lu D., Chen S., Tan X., Li N., Liu C., Li Z., Liu Z., Stupack D. G., Reisfeld R. A., Xiang R. Fra-1 promotes breast cancer chemosensitivity by driving cancer stem cells from dormancy // *Cancer Res.* – 2012. – T. 72, № 14. – C. 3451-6.

129. Sayan A. E., Stanford R., Vickery R., Grigorenko E., Diesch J., Kulbicki K., Edwards R., Pal R., Greaves P., Jariel-Encontre I., Piechaczyk M., Kriaievska M., Mellon J. K., Dhillon A. S., Tulchinsky E. Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL // *Oncogene.* – 2012. – T. 31, № 12. – C. 1493-503.

130. Zhong G., Chen X., Fang X., Wang D., Xie M., Chen Q. Fra-1 is upregulated in lung cancer tissues and inhibits the apoptosis of lung cancer cells by the P53 signaling pathway // *Oncol Rep.* – 2016. – T. 35, № 1. – C. 447-53.

131. Gomez-Casal R., Bhattacharya C., Ganesh N., Bailey L., Basse P., Gibson M., Epperly M., Levina V. Non-small cell lung cancer cells survived ionizing radiation treatment display cancer stem cell and epithelial-mesenchymal transition phenotypes // *Mol Cancer.* – 2013. – T. 12, № 1. – C. 94.

132. Siebzehnruhl F. A., Silver D. J., Tugertimur B., Deleyrolle L. P., Siebzehnruhl D., Sarkisian M. R., Devers K. G., Yachnis A. T., Kupper M. D., Neal D., Nabils N. H., Kladd M. P., Suslov O., Brabletz S., Brabletz T., Reynolds B. A., Steindler

- D. A. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance // *EMBO Mol Med.* – 2013. – Т. 5, № 8. – С. 1196-212.
133. Haber J. E. Alternative endings // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2008. – Т. 105, № 2. – С. 405-406.
134. Campisi J. Aging and cancer cell biology, 2007 // *Aging Cell.* – 2007. – Т. 6, № 3. – С. 261-3.
135. Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K., Wahl G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts // *Genes Dev.* – 1994. – Т. 8, № 21. – С. 2540-51.
136. Billen D. Spontaneous DNA damage and its significance for the "negligible dose" controversy in radiation protection // *Radiation research.* – 1990. – Т. 124, № 2. – С. 242-245.
137. Vasil'ev S. A., Stepanova E., Kutenkov O. P., Belenko A. A., Zharkova L. P., Bol'shakov M. A., Lebedev I. N., Rostov V. V. [DNA double-strand breaks in human lymphocytes after single irradiation by low doses of pulsed X-rays: non-linear dose-response relationship] // *Radiats Biol Radioecol.* – 2012. – Т. 52, № 1. – С. 31-8.
138. Озеров И. В., Осипов А. Н. Кинетическая модель репарации двунитевых разрывов ДНК в первичных фибробластах человека при действии редкоионизирующего излучения с различной мощностью дозы // *Компьютерные исследования и моделирование.* – 2015. – Т. 7, № 1. – С. 159-176.
139. Rogakou E. P., Boon C., Redon C., Bonner W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo // *J Cell Biol.* – 1999. – Т. 146, № 5. – С. 905-16.
140. Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Lobrich M., Jeggo P. A. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation // *Cancer Res.* – 2004. – Т. 64, № 7. – С. 2390-6.

141. Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A., Chen D. J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks // *J Biol Chem.* – 2001. – T. 276, № 45. – C. 42462-7.
142. Toulany M. Targeting DNA Double-Strand Break Repair Pathways to Improve Radiotherapy Response // *Genes (Basel).* – 2019. – T. 10, № 1.
143. Babayan N., Vorobyeva N., Grigoryan B., Grekhova A., Pustovalova M., Rodneva S., Fedotov Y., Tsakanova G., Aroutiounian R., Osipov A. Low Repair Capacity of DNA Double-Strand Breaks Induced by Laser-Driven Ultrashort Electron Beams in Cancer Cells // *Int J Mol Sci.* – 2020. – T. 21, № 24.
144. Seol J. H., Shim E. Y., Lee S. E. Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly // *Mutat Res.* – 2018. – T. 809. – C. 81-87.
145. Jeggo P. A., Lobrich M. How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability // *Biochem J.* – 2015. – T. 471, № 1. – C. 1-11.
146. Kakarougkas A., Jeggo P. A. DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism // *Br J Radiol.* – 2014. – T. 87, № 1035. – C. 20130685.
147. Valerie K., Povirk L. F. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair // *Oncogene.* – 2003. – T. 22, № 37. – C. 5792-812.
148. Golding S. E., Rosenberg E., Khalil A., McEwen A., Holmes M., Neill S., Povirk L. F., Valerie K. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells // *J Biol Chem.* – 2004. – T. 279, № 15. – C. 15402-10.
149. Meek K., Gupta S., Ramsden D. A., Lees-Miller S. P. The DNA-dependent protein kinase: the director at the end // *Immunol Rev.* – 2004. – T. 200. – C. 132-41.
150. Yu Y., Mahaney B. L., Yano K., Ye R., Fang S., Douglas P., Chen D. J., Lees-Miller S. P. DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not

required for repair of DNA double strand breaks // DNA Repair (Amst). – 2008. – T. 7, № 10. – C. 1680-92.

151. Szymonowicz K., Krysztofiak A., Linden J. V., Kern A., Deycmar S., Oeck S., Squire A., Koska B., Hlouschek J., Vullings M., Neander C., Siveke J. T., Matschke J., Pruschy M., Timmermann B., Jendrossek V. Proton Irradiation Increases the Necessity for Homologous Recombination Repair Along with the Indispensability of Non-Homologous End Joining // Cells. – 2020. – T. 9, № 4.

152. Povirk L. F., Zhou T., Zhou R., Cowan M. J., Yannone S. M. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease // J Biol Chem. – 2007. – T. 282, № 6. – C. 3547-58.

153. Schipler A., Iliakis G. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice // Nucleic Acids Research. – 2013. – T. 41, № 16. – C. 7589-7605.

154. Couedel C., Mills K. D., Barchi M., Shen L., Olshen A., Johnson R. D., Nussenzweig A., Essers J., Kanaar R., Li G. C., Alt F. W., Jasin M. Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells // Genes Dev. – 2004. – T. 18, № 11. – C. 1293-304.

155. Guirouilh-Barbat J., Huck S., Bertrand P., Pirzio L., Desmaze C., Sabatier L., Lopez B. S. Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells // Mol Cell. – 2004. – T. 14, № 5. – C. 611-23.

156. Mladenov E., Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways // Mutat Res. – 2011. – T. 711, № 1-2. – C. 61-72.

157. Corneo B., Wendland R. L., Deriano L., Cui X., Klein I. A., Wong S. Y., Arnal S., Holub A. J., Weller G. R., Pancake B. A., Shah S., Brandt V. L., Meek K., Roth

- D. B. Rag mutations reveal robust alternative end joining // *Nature*. – 2007. – T. 449, № 7161. – C. 483-6.
158. Liang L., Deng L., Nguyen S. C., Zhao X., Maulion C. D., Shao C., Tischfield J. A. Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – T. 36, № 10. – C. 3297-310.
159. Ma J. L., Kim E. M., Haber J. E., Lee S. E. Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences // *Mol Cell Biol.* – 2003. – T. 23, № 23. – C. 8820-8.
160. Haber J. E. Alternative endings // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – T. 105, № 2. – C. 405-6.
161. Iliakis G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence // *Radiother Oncol.* – 2009. – T. 92, № 3. – C. 310-5.
162. Wang H., Zeng Z. C., Perrault A. R., Cheng X., Qin W., Iliakis G. Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – T. 29, № 8. – C. 1653-60.
163. McKinnon P. J., Caldecott K. W. DNA strand break repair and human genetic disease // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* – 2007. – T. 8. – C. 37-55.
164. Feldmann E., Schmiemann V., Goedecke W., Reichenberger S., Pfeiffer P. DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – T. 28, № 13. – C. 2585-96.
165. Soutoglou E., Dorn J. F., Sengupta K., Jasin M., Nussenzweig A., Ried T., Danuser G., Misteli T. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells // *Nat Cell Biol.* – 2007. – T. 9, № 6. – C. 675-82.

166. Rahal E. A., Henricksen L. A., Li Y., Williams R. S., Tainer J. A., Dixon K. ATM regulates Mre11-dependent DNA end-degradation and microhomology-mediated end joining // *Cell Cycle*. – 2010. – T. 9, № 14. – C. 2866-77.
167. Virsik-Kopp P., Rave-Frank M., Hofman-Huther H., Schmidberger H. Role of DNA-PK in the process of aberration formation as studied in irradiated human glioblastoma cell lines M059K and M059J // *Int J Radiat Biol*. – 2003. – T. 79, № 1. – C. 61-8.
168. Shrivastav M., De Haro L. P., Nickoloff J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice // *Cell Res*. – 2008. – T. 18, № 1. – C. 134-47.
169. Soni A., Mladenov E., Iliakis G. Proficiency in homologous recombination repair is prerequisite for activation of G2-checkpoint at low radiation doses // *DNA Repair (Amst)*. – 2021. – T. 101. – C. 103076.
170. Mladenov E., Staudt C., Soni A., Murmann-Konda T., Siemann-Loekes M., Iliakis G. Strong suppression of gene conversion with increasing DNA double-strand break load delimited by 53BP1 and RAD52 // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – T. 48, № 4. – C. 1905-1924.
171. Narod S. A., Salmena L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer // *Discov Med*. – 2011. – T. 12, № 66. – C. 445-53.
172. Chapman J. R., Taylor M. R., Boulton S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice // *Mol Cell*. – 2012. – T. 47, № 4. – C. 497-510.
173. DiBiase S. J., Zeng Z. C., Chen R., Hyslop T., Curran W. J., Jr., Iliakis G. DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus // *Cancer Res*. – 2000. – T. 60, № 5. – C. 1245-53.
174. Hansel C., Jendrossek V., Klein D. Cellular Senescence in the Lung: The Central Role of Senescent Epithelial Cells // *Int J Mol Sci*. – 2020. – T. 21, № 9.
175. Roninson I. B. Tumor cell senescence in cancer treatment // *Cancer Res*. – 2003. – T. 63, № 11. – C. 2705-15.

176. Watson J. D. Origin of concatemeric T7 DNA // *Nat New Biol.* – 1972. – T. 239, № 94. – C. 197-201.
177. Olovnikov A. M. [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides] // *Dokl Akad Nauk SSSR.* – 1971. – T. 201, № 6. – C. 1496-9.
178. Toussaint O., Medrano E. E., von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes // *Exp Gerontol.* – 2000. – T. 35, № 8. – C. 927-45.
179. Castillo V., Valenzuela R., Huidobro C., Contreras H. R., Castellon E. A. Functional characteristics of cancer stem cells and their role in drug resistance of prostate cancer // *Int J Oncol.* – 2014. – T. 45, № 3. – C. 985-94.
180. Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a // *Cell.* – 1997. – T. 88, № 5. – C. 593-602.
181. Fridlyanskaya I., Alekseenko L., Nikolsky N. Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review // *Exp Gerontol.* – 2015. – T. 72. – C. 124-8.
182. Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Wang Y. W., Kumar P., Murray D. Multinucleated Giant Cancer Cells Produced in Response to Ionizing Radiation Retain Viability and Replicate Their Genome // *Int J Mol Sci.* – 2017. – T. 18, № 2.
183. Suzuki M., Boothman D. A. Stress-induced premature senescence (SIPS)--influence of SIPS on radiotherapy // *J Radiat Res.* – 2008. – T. 49, № 2. – C. 105-12.
184. Aliper A. M., Bozdoganyan M. E., Orekhov P. S., Zhavoronkov A., Osipov A. N. Replicative and radiation-induced aging: a comparison of gene expression profiles // *Aging (Albany NY).* – 2019. – T. 11, № 8. – C. 2378-2387.
185. Crompton N. E. Telomeres, senescence and cellular radiation response // *Cell Mol Life Sci.* – 1997. – T. 53, № 7. – C. 568-75.

186. Sabbatinelli J., Prattichizzo F., Olivieri F., Procopio A. D., Rippo M. R., Giuliani A. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells // *Front Physiol.* – 2019. – T. 10. – C. 1523.
187. Ullah I., Subbarao R. B., Rho G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective // *Biosci Rep.* – 2015. – T. 35, № 2.
188. Noren Hooten N., Evans M. K. Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence // *J Vis Exp.* – 2017.10.3791/55533 № 123.
189. Coppe J. P., Patil C. K., Rodier F., Sun Y., Munoz D. P., Goldstein J., Nelson P. S., Desprez P. Y., Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor // *PLoS Biol.* – 2008. – T. 6, № 12. – C. 2853-68.
190. Byun H. O., Lee Y. K., Kim J. M., Yoon G. From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes // *BMB Rep.* – 2015. – T. 48, № 10. – C. 549-58.
191. Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L. C., Douma S., van Doorn R., Desmet C. J., Aarden L. A., Mooi W. J., Peeper D. S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network // *Cell.* – 2008. – T. 133, № 6. – C. 1019-31.
192. Acosta J. C., O'Loughlen A., Banito A., Guijarro M. V., Augert A., Raguz S., Fumagalli M., Da Costa M., Brown C., Popov N., Takatsu Y., Melamed J., d'Adda di Fagagna F., Bernard D., Hernando E., Gil J. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence // *Cell.* – 2008. – T. 133, № 6. – C. 1006-18.
193. Hornebeck W., Maquart F. X. Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression // *Biomed Pharmacother.* – 2003. – T. 57, № 5-6. – C. 223-30.

194. Brew K., Dinakarbandian D., Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function // *Biochim Biophys Acta*. – 2000. – T. 1477, № 1-2. – C. 267-83.
195. Coppe J. P., Desprez P. Y., Krtolica A., Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression // *Annu Rev Pathol*. – 2010. – T. 5. – C. 99-118.
196. d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P., Jackson S. P. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence // *Nature*. – 2003. – T. 426, № 6963. – C. 194-8.
197. Mikula-Pietrasik J., Niklas A., Uruski P., Tykarski A., Ksiazek K. Mechanisms and significance of therapy-induced and spontaneous senescence of cancer cells // *Cell Mol Life Sci*. – 2020. – T. 77, № 2. – C. 213-229.
198. Coppe J. P., Kauser K., Campisi J., Beausejour C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence // *J Biol Chem*. – 2006. – T. 281, № 40. – C. 29568-74.
199. Taddei M. L., Cavallini L., Comito G., Giannoni E., Folini M., Marini A., Gandellini P., Morandi A., Pintus G., Raspollini M. R., Zaffaroni N., Chiarugi P. Senescent stroma promotes prostate cancer progression: the role of miR-210 // *Mol Oncol*. – 2014. – T. 8, № 8. – C. 1729-46.
200. Mosieniak G., Strzeszewska A. [The role of cellular senescence in carcinogenesis and antitumor therapy] // *Postepy Biochem*. – 2014. – T. 60, № 2. – C. 194-206.
201. Kuo P. L., Shen K. H., Hung S. H., Hsu Y. L. CXCL1/GROalpha increases cell migration and invasion of prostate cancer by decreasing fibulin-1 expression through NF-kappaB/HDAC1 epigenetic regulation // *Carcinogenesis*. – 2012. – T. 33, № 12. – C. 2477-87.

202. Rodier F., Coppe J. P., Patil C. K., Hoeijmakers W. A., Munoz D. P., Raza S. R., Freund A., Campeau E., Davalos A. R., Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion // *Nat Cell Biol.* – 2009. – T. 11, № 8. – C. 973-9.
203. Pazolli E., Alspach E., Milczarek A., Prior J., Piwnica-Worms D., Stewart S. A. Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression // *Cancer Res.* – 2012. – T. 72, № 9. – C. 2251-61.
204. Laberge R. M., Sun Y., Orjalo A. V., Patil C. K., Freund A., Zhou L., Curran S. C., Davalos A. R., Wilson-Edell K. A., Liu S., Limbad C., Demaria M., Li P., Hubbard G. B., Ikeno Y., Javors M., Desprez P. Y., Benz C. C., Kapahi P., Nelson P. S., Campisi J. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation // *Nat Cell Biol.* – 2015. – T. 17, № 8. – C. 1049-61.
205. Herranz N., Gallage S., Mellone M., Wuestefeld T., Klotz S., Hanley C. J., Raguz S., Acosta J. C., Innes A. J., Banito A., Georgilias A., Montoya A., Wolter K., Dharmalingam G., Faull P., Carroll T., Martinez-Barbera J. P., Cutillas P., Reisinger F., Heikenwalder M., Miller R. A., Withers D., Zender L., Thomas G. J., Gil J. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype // *Nat Cell Biol.* – 2015. – T. 17, № 9. – C. 1205-17.
206. Narita M., Young A. R., Arakawa S., Samarajiwa S. A., Nakashima T., Yoshida S., Hong S., Berry L. S., Reichelt S., Ferreira M., Tavaré S., Inoki K., Shimizu S., Narita M. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes // *Science.* – 2011. – T. 332, № 6032. – C. 966-70.
207. Chien Y., Scuoppo C., Wang X., Fang X., Balgley B., Bolden J. E., Premsrirut P., Luo W., Chicas A., Lee C. S., Kogan S. C., Lowe S. W. Control of the

- senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity // *Genes Dev.* – 2011. – T. 25, № 20. – C. 2125-36.
208. Passos J. F., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C. J., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., Saretzki G., Rudolph K. L., Kirkwood T. B., von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence // *Mol Syst Biol.* – 2010. – T. 6. – C. 347.
209. Wiley C. D., Velarde M. C., Lecot P., Liu S., Sarnoski E. A., Freund A., Shirakawa K., Lim H. W., Davis S. S., Ramanathan A., Gerencser A. A., Verdin E., Campisi J. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype // *Cell Metab.* – 2016. – T. 23, № 2. – C. 303-14.
210. Ksiazek K., Korybalska K., Jorres A., Witowski J. Accelerated senescence of human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose: the role of TGF-beta1 // *Lab Invest.* – 2007. – T. 87, № 4. – C. 345-56.
211. Chondrogianni N., Stratford F. L., Trougakos I. P., Friguet B., Rivett A. J., Gonos E. S. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation // *J Biol Chem.* – 2003. – T. 278, № 30. – C. 28026-37.
212. Keyes W. M., Wu Y., Vogel H., Guo X., Lowe S. W., Mills A. A. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging // *Genes Dev.* – 2005. – T. 19, № 17. – C. 1986-99.
213. Papazoglu C., Mills A. A. p53: at the crossroad between cancer and ageing // *J Pathol.* – 2007. – T. 211, № 2. – C. 124-33.
214. Chen Q., Ames B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – T. 91, № 10. – C. 4130-4.

215. Bae G. U., Seo D. W., Kwon H. K., Lee H. Y., Hong S., Lee Z. W., Ha K. S., Lee H. W., Han J. W. Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway // *J Biol Chem.* – 1999. – T. 274, № 46. – C. 32596-602.
216. Radisavljevic Z. M., Gonzalez-Flecha B. TOR kinase and Ran are downstream from PI3K/Akt in H₂O₂-induced mitosis // *J Cell Biochem.* – 2004. – T. 91, № 6. – C. 1293-300.
217. Krouwer V. J., Hekking L. H., Langelaar-Makkinje M., Regan-Klapisz E., Post J. A. Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability // *Vasc Cell.* – 2012. – T. 4, № 1. – C. 12.
218. Statuto M., Bianchi C., Perego R., Del Monte U. Drop of connexin 43 in replicative senescence of human fibroblasts HEL-299 as a possible biomarker of senescence // *Exp Gerontol.* – 2002. – T. 37, № 8-9. – C. 1113-20.
219. Ksiazek K., Piatek K., Witowski J. Impaired response to oxidative stress in senescent cells may lead to accumulation of DNA damage in mesothelial cells from aged donors // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – T. 373, № 2. – C. 335-9.
220. Sidler C., Kovalchuk O., Kovalchuk I. Epigenetic Regulation of Cellular Senescence and Aging // *Front Genet.* – 2017. – T. 8. – C. 138.
221. Calio A., Zamo A., Ponzoni M., Zanolin M. E., Ferreri A. J., Pedron S., Montagna L., Parolini C., Fraifeld V. E., Wolfson M., Yanai H., Pizzolo G., Doglioni C., Vinante F., Chilosì M. Cellular Senescence Markers p16INK4a and p21CIP1/WAF Are Predictors of Hodgkin Lymphoma Outcome // *Clin Cancer Res.* – 2015. – T. 21, № 22. – C. 5164-72.
222. Gorgoulis V., Adams P. D., Alimonti A., Bennett D. C., Bischof O., Bishop C., Campisi J., Collado M., Evangelou K., Ferbeyre G., Gil J., Hara E., Krizhanovsky V., Jurk D., Maier A. B., Narita M., Niedernhofer L., Passos J. F., Robbins P. D., Schmitt C. A., Sedivy J., Vougas K., von Zglinicki T., Zhou D., Serrano M., Demaria

M. Cellular Senescence: Defining a Path Forward // *Cell*. – 2019. – T. 179, № 4. – C. 813-827.

223. Evangelou K., Lougiakis N., Rizou S. V., Kotsinas A., Kletsas D., Munoz-Espin D., Kastrinakis N. G., Pouli N., Marakos P., Townsend P., Serrano M., Bartek J., Gorgoulis V. G. Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens // *Aging Cell*. – 2017. – T. 16, № 1. – C. 192-197.

224. Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J. M., Dulic V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence // *EMBO J*. – 2004. – T. 23, № 13. – C. 2554-63.

225. Naka K., Tachibana A., Ikeda K., Motoyama N. Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts // *J Biol Chem*. – 2004. – T. 279, № 3. – C. 2030-7.

226. Sikora E., Czarnecka-Herok J., Bojko A., Sunderland P. Therapy-induced polyploidization and senescence: Coincidence or interconnection? // *Semin Cancer Biol*. – 2022. – T. 81. – C. 83-95.

227. Ewald J. A., Desotelle J. A., Wilding G., Jarrard D. F. Therapy-induced senescence in cancer // *J Natl Cancer Inst*. – 2010. – T. 102, № 20. – C. 1536-46.

228. Wang Q., Wu P. C., Dong D. Z., Ivanova I., Chu E., Zeliadt S., Vesselle H., Wu D. Y. Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape // *Int J Cancer*. – 2013. – T. 132, № 7. – C. 1505-15.

229. Chakradeo S., Elmore L. W., Gewirtz D. A. Is Senescence Reversible? // *Curr Drug Targets*. – 2016. – T. 17, № 4. – C. 460-6.

230. Leong W. F., Chau J. F., Li B. p53 Deficiency leads to compensatory up-regulation of p16INK4a // *Mol Cancer Res*. – 2009. – T. 7, № 3. – C. 354-60.

231. Mirzayans R., Andrais B., Kumar P., Murray D. Significance of Wild-Type p53 Signaling in Suppressing Apoptosis in Response to Chemical Genotoxic Agents: Impact on Chemotherapy Outcome // *Int J Mol Sci*. – 2017. – T. 18, № 5.

232. Han Z., Wei W., Dunaway S., Darnowski J. W., Calabresi P., Sedivy J., Hendrickson E. A., Balan K. V., Pantazis P., Wyche J. H. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin // *J Biol Chem.* – 2002. – T. 277, № 19. – C. 17154-60.
233. Hernandez-Vargas H., Ballestar E., Carmona-Saez P., von Kobbe C., Banon-Rodriguez I., Esteller M., Moreno-Bueno G., Palacios J. Transcriptional profiling of MCF7 breast cancer cells in response to 5-Fluorouracil: relationship with cell cycle changes and apoptosis, and identification of novel targets of p53 // *Int J Cancer.* – 2006. – T. 119, № 5. – C. 1164-75.
234. Alani R. M., Young A. Z., Shifflett C. B. Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – T. 98, № 14. – C. 7812-6.
235. Polsky D., Young A. Z., Busam K. J., Alani R. M. The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas // *Cancer Res.* – 2001. – T. 61, № 16. – C. 6008-11.
236. Liu D., Hornsby P. J. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion // *Cancer Res.* – 2007. – T. 67, № 7. – C. 3117-26.
237. Mikula-Pietrasik J., Sosinska P., Maksin K., Kucinska M. G., Piotrowska H., Murias M., Wozniak A., Szpurek D., Ksiazek K. Colorectal cancer-promoting activity of the senescent peritoneal mesothelium // *Oncotarget.* – 2015. – T. 6, № 30. – C. 29178-95.
238. Wang T., Notta F., Navab R., Joseph J., Ibrahimov E., Xu J., Zhu C. Q., Borgida A., Gallinger S., Tsao M. S. Senescent Carcinoma-Associated Fibroblasts Upregulate IL8 to Enhance Prometastatic Phenotypes // *Mol Cancer Res.* – 2017. – T. 15, № 1. – C. 3-14.

239. Mikula-Pietrasik J., Sosinska P., Naumowicz E., Maksin K., Piotrowska H., Wozniak A., Szpurek D., Ksiazek K. Senescent peritoneal mesothelium induces a pro-angiogenic phenotype in ovarian cancer cells in vitro and in a mouse xenograft model in vivo // *Clin Exp Metastasis*. – 2016. – Т. 33, № 1. – С. 15-27.
240. Ruhland M. K., Loza A. J., Capietto A. H., Luo X., Knolhoff B. L., Flanagan K. C., Belt B. A., Alspach E., Leahy K., Luo J., Schaffer A., Edwards J. R., Longmore G., Faccio R., DeNardo D. G., Stewart S. A. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis // *Nat Commun*. – 2016. – Т. 7. – С. 11762.
241. Ohanna M., Giuliano S., Bonet C., Imbert V., Hofman V., Zangari J., Bille K., Robert C., Bressac-de Paillerets B., Hofman P., Rocchi S., Peyron J. F., Lacour J. P., Ballotti R., Bertolotto C. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS) // *Genes Dev*. – 2011. – Т. 25, № 12. – С. 1245-61.
242. Rovillain E., Mansfield L., Caetano C., Alvarez-Fernandez M., Caballero O. L., Medema R. H., Hummerich H., Jat P. S. Activation of nuclear factor- κ B signalling promotes cellular senescence // *Oncogene*. – 2011. – Т. 30, № 20. – С. 2356-66.
243. Schmitt C. A. Cellular senescence and cancer treatment // *Biochim Biophys Acta*. – 2007. – Т. 1775, № 1. – С. 5-20.
244. Бородкина А., Дерябин П., Грюкова А., Никольский Н. " Социальная жизнь" стареющих клеток: что такое SASP и зачем его изучать? // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). – 2018. – Т. 10, № 1 (36). – С. 4-15.
245. Yahyapour R., Salajegheh A., Safari A., Amini P., Rezaeyan A., Amraee A., Najafi M. Radiation-induced Non-targeted Effect and Carcinogenesis; Implications in Clinical Radiotherapy // *J Biomed Phys Eng*. – 2018. – Т. 8, № 4. – С. 435-446.

246. Lehmann B. D., McCubrey J. A., Jefferson H. S., Paine M. S., Chappell W. H., Terrian D. M. A dominant role for p53-dependent cellular senescence in radiosensitization of human prostate cancer cells // *Cell Cycle*. – 2007. – T. 6, № 5. – C. 595-605.
247. Luo H., Yount C., Lang H., Yang A., Riemer E. C., Lyons K., Vanek K. N., Silvestri G. A., Schulte B. A., Wang G. Y. Activation of p53 with Nutlin-3a radiosensitizes lung cancer cells via enhancing radiation-induced premature senescence // *Lung Cancer*. – 2013. – T. 81, № 2. – C. 167-73.
248. He X., Yang A., McDonald D. G., Riemer E. C., Vanek K. N., Schulte B. A., Wang G. Y. MiR-34a modulates ionizing radiation-induced senescence in lung cancer cells // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8, № 41. – C. 69797-69807.
249. Mirzayans R., Scott A., Cameron M., Murray D. Induction of accelerated senescence by gamma radiation in human solid tumor-derived cell lines expressing wild-type TP53 // *Radiat Res*. – 2005. – T. 163, № 1. – C. 53-62.
250. Wang M., Morsbach F., Sander D., Gheorghiu L., Nanda A., Benes C., Kriegs M., Krause M., Dikomey E., Baumann M., Dahm-Daphi J., Settleman J., Willers H. EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks // *Cancer Res*. – 2011. – T. 71, № 19. – C. 6261-9.
251. Liao E. C., Hsu Y. T., Chuah Q. Y., Lee Y. J., Hu J. Y., Huang T. C., Yang P. M., Chiu S. J. Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations // *Cell Death Dis*. – 2014. – T. 5. – C. e1255.
252. Xu J., Patel N. H., Saleh T., Cudjoe E. K., Jr., Alotaibi M., Wu Y., Lima S., Hawkrige A. M., Gewirtz D. A. Differential Radiation Sensitivity in p53 Wild-Type and p53-Deficient Tumor Cells Associated with Senescence but not Apoptosis or (Nonprotective) Autophagy // *Radiat Res*. – 2018. – T. 190, № 5. – C. 538-557.

253. Jallepalli P. V., Waizenegger I. C., Bunz F., Langer S., Speicher M. R., Peters J. M., Kinzler K. W., Vogelstein B., Lengauer C. Securin is required for chromosomal stability in human cells // *Cell*. – 2001. – T. 105, № 4. – C. 445-57.
254. Tfelt-Hansen J., Kanuparthi D., Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis // *Clin Med Res*. – 2006. – T. 4, № 2. – C. 130-7.
255. Lee J. J., Kim B. C., Park M. J., Lee Y. S., Kim Y. N., Lee B. L., Lee J. S. PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation // *Cell Death Differ*. – 2011. – T. 18, № 4. – C. 666-77.
256. Puck T. T., Marcus P. I. Action of x-rays on mammalian cells // *J Exp Med*. – 1956. – T. 103, № 5. – C. 653-66.
257. Puig P. E., Guilly M. N., Bouchot A., Droin N., Cathelin D., Bouyer F., Favier L., Ghiringhelli F., Kroemer G., Solary E., Martin F., Chauffert B. Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy // *Cell Biol Int*. – 2008. – T. 32, № 9. – C. 1031-43.
258. Mirzayans R., Andrais B., Murray D. Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment // *Cancers (Basel)*. – 2018. – T. 10, № 4.
259. Zhang Z., Feng X., Deng Z., Cheng J., Wang Y., Zhao M., Zhao Y., He S., Huang Q. Irradiation-induced polyploid giant cancer cells are involved in tumor cell repopulation via neosis // *Mol Oncol*. – 2021. – T. 15, № 8. – C. 2219-2234.
260. Coward J., Harding A. Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer // *Front Oncol*. – 2014. – T. 4. – C. 123.
261. Zhang S., Mercado-Uribe I., Xing Z., Sun B., Kuang J., Liu J. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells // *Oncogene*. – 2014. – T. 33, № 1. – C. 116-28.

262. Vitale I., Galluzzi L., Senovilla L., Criollo A., Jemaa M., Castedo M., Kroemer G. Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization // *Cell Death Differ.* – 2011. – T. 18, № 9. – C. 1403-13.
263. Lv H., Shi Y., Zhang L., Zhang D., Liu G., Yang Z., Li Y., Fei F., Zhang S. Polyploid giant cancer cells with budding and the expression of cyclin E, S-phase kinase-associated protein 2, stathmin associated with the grading and metastasis in serous ovarian tumor // *BMC Cancer.* – 2014. – T. 14. – C. 576.
264. Qu Y., Zhang L., Rong Z., He T., Zhang S. Number of glioma polyploid giant cancer cells (PGCCs) associated with vasculogenic mimicry formation and tumor grade in human glioma // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2013. – T. 32. – C. 75.
265. Rohalter V., Roth K., Finkernagel F., Adhikary T., Obert J., Dorzweiler K., Bensberg M., Muller-Brusselbach S., Muller R. A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistant ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype // *Oncotarget.* – 2015. – T. 6, № 37. – C. 40005-25.
266. Glassmann A., Carrillo Garcia C., Janzen V., Kraus D., Veit N., Winter J., Probstmeier R. Staurosporine Induces the Generation of Polyploid Giant Cancer Cells in Non-Small-Cell Lung Carcinoma A549 Cells // *Anal Cell Pathol (Amst).* – 2018. – T. 2018. – C. 1754085.
267. Gomes C. J., Centuori S. M., Harman M. W., Putnam C. W., Wolgemuth C. W., Martinez J. D. The induction of endoreduplication and polyploidy by elevated expression of 14-3-3gamma // *Genes Cancer.* – 2017. – T. 8, № 11-12. – C. 771-783.
268. Erenpreisa J., Salmina K., Huna A., Kosmacek E. A., Cragg M. S., Ianzini F., Anisimov A. P. Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation // *Cell Biol Int.* – 2011. – T. 35, № 7. – C. 687-95.

269. Gewirtz D. A. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy // *Autophagy*. – 2009. – T. 5, № 8. – C. 1232-4.
270. Erenpreisa J., Cragg M. S. MOS, aneuploidy and the ploidy cycle of cancer cells // *Oncogene*. – 2010. – T. 29, № 40. – C. 5447-51.
271. Vitale I., Senovilla L., Jemaa M., Michaud M., Galluzzi L., Kepp O., Nanty L., Criollo A., Rello-Varona S., Manic G., Metivier D., Vivet S., Tajeddine N., Joza N., Valent A., Castedo M., Kroemer G. Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos // *EMBO J*. – 2010. – T. 29, № 7. – C. 1272-84.
272. Hosaka M., Hatori M., Smith R., Kokubun S. Giant cell formation through fusion of cells derived from a human giant cell tumor of tendon sheath // *J Orthop Sci*. – 2004. – T. 9, № 6. – C. 581-4.
273. Brodbeck W. G., Anderson J. M. Giant cell formation and function // *Curr Opin Hematol*. – 2009. – T. 16, № 1. – C. 53-7.
274. Holland A. J., Cleveland D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2009. – T. 10, № 7. – C. 478-87.
275. Krajcovic M., Overholtzer M. Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism // *Cancer Res*. – 2012. – T. 72, № 7. – C. 1596-601.
276. Saini G., Joshi S., Garlapati C., Li H., Kong J., Krishnamurthy J., Reid M. D., Aneja R. Polyploid giant cancer cell characterization: New frontiers in predicting response to chemotherapy in breast cancer // *Semin Cancer Biol*. – 2022. – T. 81. – C. 220-231.
277. Erenpreisa J., Kalejs M., Cragg M. S. Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution // *Cell Biol Int*. – 2005. – T. 29, № 12. – C. 1012-8.

278. Chen J., Niu N., Zhang J., Qi L., Shen W., Donkena K. V., Feng Z., Liu J. Polyploid Giant Cancer Cells (PGCCs): The Evil Roots of Cancer // *Curr Cancer Drug Targets*. – 2019. – T. 19, № 5. – C. 360-367.
279. Rengstl B., Newrzela S., Heinrich T., Weiser C., Thalheimer F. B., Schmid F., Warner K., Hartmann S., Schroeder T., Kuppers R., Rieger M. A., Hansmann M. L. Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed-Sternberg cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2013. – T. 110, № 51. – C. 20729-34.
280. Kaur E., Rajendra J., Jadhav S., Shridhar E., Goda J. S., Moiyadi A., Dutt S. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence // *Carcinogenesis*. – 2015. – T. 36, № 6. – C. 685-695.
281. Sundaram M., Guernsey D. L., Rajaraman M. M., Rajaraman R. Neosis: a novel type of cell division in cancer // *Cancer Biol Ther*. – 2004. – T. 3, № 2. – C. 207-18.
282. Illidge T. M., Cragg M. S., Fringes B., Olive P., Erenpreisa J. A. Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage // *Cell Biol Int*. – 2000. – T. 24, № 9. – C. 621-33.
283. Niu N., Zhang J., Zhang N., Mercado-Uribe I., Tao F., Han Z., Pathak S., Multani A. S., Kuang J., Yao J., Bast R. C., Sood A. K., Hung M. C., Liu J. Linking genomic reorganization to tumor initiation via the giant cell cycle // *Oncogenesis*. – 2016. – T. 5, № 12. – C. e281.
284. Erenpreisa J., Salmina K., Huna A., Jackson T. R., Vazquez-Martin A., Cragg M. S. The "virgin birth", polyploidy, and the origin of cancer // *Oncoscience*. – 2015. – T. 2, № 1. – C. 3-14.
285. Erenpreisa J., Cragg M. S. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal // *Cancer Cell Int*. – 2013. – T. 13, № 1. – C. 92.

286. Erenpreisa J. A., Cragg M. S., Fringes B., Sharakhov I., Illidge T. M. Release of mitotic descendants by giant cells from irradiated Burkitt's lymphoma cell line // *Cell Biol Int.* – 2000. – T. 24, № 9. – C. 635-48.
287. Liu J., Niu N., Li X., Zhang X., Sood A. K. The life cycle of polyploid giant cancer cells and dormancy in cancer: Opportunities for novel therapeutic interventions // *Semin Cancer Biol.* – 2022. – T. 81. – C. 132-144.
288. Kostal V. Eco-physiological phases of insect diapause // *J Insect Physiol.* – 2006. – T. 52, № 2. – C. 113-27.
289. Kostal V., Stetina T., Poupardin R., Korbelova J., Bruce A. W. Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – T. 114, № 32. – C. 8532-8537.
290. Chen S., Stout J. R., Dharmiah S., Yde S., Calvi B. R., Walczak C. E. Transient endoreplication down-regulates the kinesin-14 HSET and contributes to genomic instability // *Mol Biol Cell.* – 2016. – T. 27, № 19. – C. 2911-23.
291. Niu N., Mercado-Urbe I., Liu J. Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells // *Oncogene.* – 2017. – T. 36, № 34. – C. 4887-4900.
292. Erenpreisa J., Ivanov A., Wheatley S. P., Kosmacek E. A., Ianzini F., Anisimov A. P., Mackey M., Davis P. J., Plakhins G., Illidge T. M. Endopolyploidy in irradiated p53-deficient tumour cell lines: persistence of cell division activity in giant cells expressing Aurora-B kinase // *Cell Biol Int.* – 2008. – T. 32, № 9. – C. 1044-56.
293. Sheikh M. S., Rochefort H., Garcia M. Overexpression of p21WAF1/CIP1 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines // *Oncogene.* – 1995. – T. 11, № 9. – C. 1899-905.

294. Douglas-Jones A. G., Barr W. T. Breast carcinoma with tumor giant cells. Report of a case with fine needle aspiration cytology // *Acta Cytol.* – 1989. – T. 33, № 1. – C. 109-14.
295. Kawano H., Kubota T., Sato K., Goya T., Arikawa S., Wakisaka S. Immunohistochemical study of giant cell in glioblastoma // *Clin Neuropathol.* – 1995. – T. 14, № 2. – C. 118-23.
296. Weihua Z., Lin Q., Ramoth A. J., Fan D., Fidler I. J. Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell // *Cancer.* – 2011. – T. 117, № 17. – C. 4092-9.
297. Zheng L., Dai H., Zhou M., Li X., Liu C., Guo Z., Wu X., Wu J., Wang C., Zhong J., Huang Q., Garcia-Aguilar J., Pfeifer G. P., Shen B. Polyploid cells rewire DNA damage response networks to overcome replication stress-induced barriers for tumour progression // *Nat Commun.* – 2012. – T. 3. – C. 815.
298. Fei F., Zhang D., Yang Z., Wang S., Wang X., Wu Z., Wu Q., Zhang S. The number of polyploid giant cancer cells and epithelial-mesenchymal transition-related proteins are associated with invasion and metastasis in human breast cancer // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2015. – T. 34. – C. 158.
299. Zhang S., Zhang D., Yang Z., Zhang X. Tumor Budding, Micropapillary Pattern, and Polyploidy Giant Cancer Cells in Colorectal Cancer: Current Status and Future Prospects // *Stem Cells Int.* – 2016. – T. 2016. – C. 4810734.
300. Mirzayans R., Andrais B., Murray D. Impact of Premature Senescence on Radiosensitivity Measured by High Throughput Cell-Based Assays // *Int J Mol Sci.* – 2017. – T. 18, № 7.
301. Mittal K., Donthamsetty S., Kaur R., Yang C., Gupta M. V., Reid M. D., Choi D. H., Rida P. C. G., Aneja R. Multinucleated polyploidy drives resistance to Docetaxel chemotherapy in prostate cancer // *Br J Cancer.* – 2017. – T. 116, № 9. – C. 1186-1194.

302. Erenpreisa J., Kalejs M., Ianzini F., Kosmacek E. A., Mackey M. A., Emzinsh D., Cragg M. S., Ivanov A., Illidge T. M. Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe // *Cell Biol Int.* – 2005. – T. 29, № 12. – C. 1005-11.
303. Mirzayans R., Andrais B., Murray D. Do Multiwell Plate High Throughput Assays Measure Loss of Cell Viability Following Exposure to Genotoxic Agents? // *Int J Mol Sci.* – 2017. – T. 18, № 8.
304. Zhang S., Mercado-Urbe I., Liu J. Tumor stroma and differentiated cancer cells can be originated directly from polyploid giant cancer cells induced by paclitaxel // *Int J Cancer.* – 2014. – T. 134, № 3. – C. 508-18.
305. Khamis Z. I., Sahab Z. J., Sang Q. X. Active roles of tumor stroma in breast cancer metastasis // *Int J Breast Cancer.* – 2012. – T. 2012. – C. 574025.
306. Sun B., Zhang S., Zhang D., Du J., Guo H., Zhao X., Zhang W., Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma // *Oncol Rep.* – 2006. – T. 16, № 4. – C. 693-8.
307. Lagadec C., Vlashi E., Della Donna L., Dekmezian C., Pajonk F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells // *Stem Cells.* – 2012. – T. 30, № 5. – C. 833-44.
308. Salmina K., Jankevics E., Huna A., Perminov D., Radovica I., Klymenko T., Ivanov A., Jascenko E., Scherthan H., Cragg M., Erenpreisa J. Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells // *Exp Cell Res.* – 2010. – T. 316, № 13. – C. 2099-112.
309. Gerashchenko B. I., Salmina K., Eglitis J., Huna A., Grjunberga V., Erenpreisa J. Disentangling the aneuploidy and senescence paradoxes: a study of triploid breast cancers non-responsive to neoadjuvant therapy // *Histochem Cell Biol.* – 2016. – T. 145, № 4. – C. 497-508.

310. Diaz-Carballo D., Saka S., Klein J., Rennkamp T., Acikelli A. H., Malak S., Jastrow H., Wennemuth G., Tempfer C., Schmitz I., Tannapfel A., Strumberg D. A Distinct Oncogenerative Multinucleated Cancer Cell Serves as a Source of Stemness and Tumor Heterogeneity // *Cancer Res.* – 2018. – T. 78, № 9. – C. 2318-2331.
311. Leikam C., Hufnagel A. L., Otto C., Murphy D. J., Muhling B., Kneitz S., Nanda I., Schmid M., Wagner T. U., Haferkamp S., Brocker E. B., Scharl M., Meierjohann S. In vitro evidence for senescent multinucleated melanocytes as a source for tumor-initiating cells // *Cell Death Dis.* – 2015. – T. 6. – C. e1711.
312. Zhang S., Mercado-Uribe I., Sood A., Bast R. C., Liu J. Coevolution of neoplastic epithelial cells and multilineage stroma via polyploid giant cells during immortalization and transformation of mullerian epithelial cells // *Genes Cancer.* – 2016. – T. 7, № 3-4. – C. 60-72.
313. Gupta Y., Pasupuleti V., Du W., Welford S. M. Macrophage Migration Inhibitory Factor Secretion Is Induced by Ionizing Radiation and Oxidative Stress in Cancer Cells // *PLoS One.* – 2016. – T. 11, № 1. – C. e0146482.
314. Parekh A., Das S., Parida S., Das C. K., Dutta D., Mallick S. K., Wu P. H., Kumar B. N. P., Bharti R., Dey G., Banerjee K., Rajput S., Bharadwaj D., Pal I., Dey K. K., Rajesh Y., Jena B. C., Biswas A., Banik P., Pradhan A. K., Das S. K., Das A. K., Dhara S., Fisher P. B., Wirtz D., Mills G. B., Mandal M. Multi-nucleated cells use ROS to induce breast cancer chemo-resistance in vitro and in vivo // *Oncogene.* – 2018. – T. 37, № 33. – C. 4546-4561.
315. Guda M. R., Rashid M. A., Asuthkar S., Jalasutram A., Caniglia J. L., Tsung A. J., Velpula K. K. Pleiotropic role of macrophage migration inhibitory factor in cancer // *Am J Cancer Res.* – 2019. – T. 9, № 12. – C. 2760-2773.
316. Toi M., Hoshina S., Takayanagi T., Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer // *Jpn J Cancer Res.* – 1994. – T. 85, № 10. – C. 1045-9.

317. Roberson R. S., Kussick S. J., Vallieres E., Chen S. Y., Wu D. Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers // *Cancer Res.* – 2005. – T. 65, № 7. – C. 2795-803.
318. Wang Q., Wu P. C., Roberson R. S., Luk B. V., Ivanova I., Chu E., Wu D. Y. Survivin and escaping in therapy-induced cellular senescence // *Int J Cancer.* – 2011. – T. 128, № 7. – C. 1546-58.
319. Blagosklonny M. V. Cancer stem cell and cancer stemoids: from biology to therapy // *Cancer Biol Ther.* – 2007. – T. 6, № 11. – C. 1684-90.
320. Ianzini F., Kosmacek E. A., Nelson E. S., Napoli E., Erenpreisa J., Kalejs M., Mackey M. A. Activation of meiosis-specific genes is associated with depolyploidization of human tumor cells following radiation-induced mitotic catastrophe // *Cancer Res.* – 2009. – T. 69, № 6. – C. 2296-304.
321. Elmore L. W., Di X., Dumur C., Holt S. E., Gewirtz D. A. Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: implications for treatment response // *Clin Cancer Res.* – 2005. – T. 11, № 7. – C. 2637-43.
322. Sliwinska M. A., Mosieniak G., Wolanin K., Babik A., Piwocka K., Magalska A., Szczepanowska J., Fronk J., Sikora E. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells // *Mech Ageing Dev.* – 2009. – T. 130, № 1-2. – C. 24-32.
323. Was H., Czarnecka J., Kominek A., Barszcz K., Bernas T., Piwocka K., Kaminska B. Some chemotherapeutics-treated colon cancer cells display a specific phenotype being a combination of stem-like and senescent cell features // *Cancer Biol Ther.* – 2018. – T. 19, № 1. – C. 63-75.
324. Mosieniak G., Sliwinska M. A., Alster O., Strzeszewska A., Sunderland P., Piechota M., Was H., Sikora E. Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence // *Neoplasia.* – 2015. – T. 17, № 12. – C. 882-893.

325. Ogden A., Rida P. C., Knudsen B. S., Kucuk O., Aneja R. Docetaxel-induced polyploidization may underlie chemoresistance and disease relapse // *Cancer Lett.* – 2015. – Т. 367, № 2. – С. 89-92.
326. Киселева Л. Н., Карташев А. В., Вартамян Н. Л., Пиневиц А. А., Самойлович М. П. Резистентные к действию генотоксических факторов многоядерные клетки в культивируемых линиях глиобластом человека // *Цитология.* – 2018. – Т. 60, № 8. – С. 616-622.
327. Vartanyan N., Pinevich A., Bode I., Samoylovich M. Polyploid giant cancer cells and their role in the formation of resistance to therapeutic treatment // *Journal of Modern Oncology.* – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 105-108.
328. Fei F., Zhang M., Li B., Zhao L., Wang H., Liu L., Li Y., Ding P., Gu Y., Zhang X., Jiang T., Zhu S., Zhang S. Formation of Polyploid Giant Cancer Cells Involves in the Prognostic Value of Neoadjuvant Chemoradiation in Locally Advanced Rectal Cancer // *J Oncol.* – 2019. – Т. 2019. – С. 2316436.
329. Borowicz S., Van Scoyk M., Avasarala S., Karuppusamy Rathinam M. K., Tauler J., Bikkavilli R. K., Winn R. A. The soft agar colony formation assay // *J Vis Exp.* – 2014.10.3791/51998 № 92. – С. e51998.
330. Guadamillas M. C., Cerezo A., Del Pozo M. A. Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer // *J Cell Sci.* – 2011. – Т. 124, № Pt 19. – С. 3189-97.
331. Shin S. I., Freedman V. H., Risser R., Pollack R. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1975. – Т. 72, № 11. – С. 4435-9.
332. Morata-Tarifa C., Jimenez G., Garcia M. A., Entrena J. M., Grinan-Lison C., Aguilera M., Picon-Ruiz M., Marchal J. A. Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells // *Sci Rep.* – 2016. – Т. 6. – С. 18772.

333. Chen Y., Pan D., Du Y., Jia R., Li X., Hu B. Induction of cancer stem-like cells in A549 cells after exposure to carbon ions and X-rays // *International Journal of Radiation Research*. – 2019. – T. 17, № 1. – C. 25-35.
334. Adisheshaiah P., Vaz M., Machireddy N., Kalvakolanu D. V., Reddy S. P. A Fra-1-dependent, matrix metalloproteinase driven EGFR activation promotes human lung epithelial cell motility and invasion // *J Cell Physiol*. – 2008. – T. 216, № 2. – C. 405-12.
335. Stiewe T., Putzer B. M. Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? // *Cell Death Differ*. – 2002. – T. 9, № 3. – C. 237-45.
336. Cuddihy A. R., Bristow R. G. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? // *Cancer Metastasis Rev*. – 2004. – T. 23, № 3-4. – C. 237-57.
337. Herbein G., Nehme Z. Polyploid Giant Cancer Cells, a Hallmark of Oncoviruses and a New Therapeutic Challenge // *Front Oncol*. – 2020. – T. 10. – C. 567116.
338. Yeung K. T., Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis // *Mol Oncol*. – 2017. – T. 11, № 1. – C. 28-39.
339. Schaeffer D., Somarelli J. A., Hanna G., Palmer G. M., Garcia-Blanco M. A. Cellular migration and invasion uncoupled: increased migration is not an inexorable consequence of epithelial-to-mesenchymal transition // *Mol Cell Biol*. – 2014. – T. 34, № 18. – C. 3486-99.
340. Hollestelle A., Peeters J. K., Smid M., Timmermans M., Verhoog L. C., Westenend P. J., Heine A. A., Chan A., Sieuwerts A. M., Wiemer E. A., Klijn J. G., van der Spek P. J., Foekens J. A., Schutte M., den Bakker M. A., Martens J. W. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer // *Breast Cancer Res Treat*. – 2013. – T. 138, № 1. – C. 47-57.

341. Jiang P., Du W., Wang X., Mancuso A., Gao X., Wu M., Yang X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase // *Nat Cell Biol.* – 2011. – T. 13, № 3. – C. 310-6.
342. Pustovalova M., Alhaddad L., Smetanina N., Chigasova A., Blokhina T., Chuprov-Netochin R., Osipov A. N., Leonov S. 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 // *Int J Mol Sci.* – 2020. – T. 21, № 9.
343. Talos F., Nemaajerova A., Flores E. R., Petrenko O., Moll U. M. p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53 // *Mol Cell.* – 2007. – T. 27, № 4. – C. 647-59.
344. Aylon Y., Oren M. p53: guardian of ploidy // *Mol Oncol.* – 2011. – T. 5, № 4. – C. 315-23.
345. Davoli T., Denchi E. L., de Lange T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy // *Cell.* – 2010. – T. 141, № 1. – C. 81-93.
346. Dewhurst S. M., McGranahan N., Burrell R. A., Rowan A. J., Gronroos E., Endesfelder D., Joshi T., Mouradov D., Gibbs P., Ward R. L., Hawkins N. J., Szallasi Z., Sieber O. M., Swanton C. Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution // *Cancer Discov.* – 2014. – T. 4, № 2. – C. 175-185.
347. Nakayama Y., Igarashi A., Kikuchi I., Obata Y., Fukumoto Y., Yamaguchi N. Bleomycin-induced over-replication involves sustained inhibition of mitotic entry through the ATM/ATR pathway // *Exp Cell Res.* – 2009. – T. 315, № 15. – C. 2515-28.
348. Lin Y. L., Sengupta S., Gurdziel K., Bell G. W., Jacks T., Flores E. R. p63 and p73 transcriptionally regulate genes involved in DNA repair // *PLoS Genet.* – 2009. – T. 5, № 10. – C. e1000680.

349. Crum C. P., McKeon F. D. p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia // *Annu Rev Pathol.* – 2010. – T. 5. – C. 349-71.
350. Su P., Yuan Y., Huang Y., Wang W., Zhang Z. Anorectal malformation associated with a mutation in the P63 gene in a family with split hand-foot malformation // *Int J Colorectal Dis.* – 2013. – T. 28, № 12. – C. 1621-7.
351. Subramanian D., Bunjobpol W., Sabapathy K. Interplay between TAp73 Protein and Selected Activator Protein-1 (AP-1) Family Members Promotes AP-1 Target Gene Activation and Cellular Growth // *J Biol Chem.* – 2015. – T. 290, № 30. – C. 18636-49.
352. Rozenberg J. M., Zvereva S., Dalina A., Blatov I., Zubarev I., Luppov D., Bessmertnyi A., Romanishin A., Alsoulaiman L., Kumeiko V., Kagansky A., Melino G., Ganini C., Barlev N. A. The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response // *Biol Direct.* – 2021. – T. 16, № 1. – C. 23.
353. Rozenberg J. M., Zvereva S., Dalina A., Blatov I., Zubarev I., Luppov D., Bessmertnyi A., Romanishin A., Alsoulaiman L., Kumeiko V., Kagansky A., Melino G., Barlev N. A. Dual Role of p73 in Cancer Microenvironment and DNA Damage Response // *Cells.* – 2021. – T. 10, № 12.
354. Marrazzo E., Marchini S., Tavecchio M., Alberio T., Previdi S., Erba E., Rotter V., Brogginini M. The expression of the DeltaNp73beta isoform of p73 leads to tetraploidy // *Eur J Cancer.* – 2009. – T. 45, № 3. – C. 443-53.
355. Davoli T., de Lange T. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells // *Cancer Cell.* – 2012. – T. 21, № 6. – C. 765-76.
356. Boudreau H. E., Casterline B. W., Burke D. J., Leto T. L. Wild-type and mutant p53 differentially regulate NADPH oxidase 4 in TGF-beta-mediated migration of human lung and breast epithelial cells // *Br J Cancer.* – 2014. – T. 110, № 10. – C. 2569-82.

357. Bensaad K., Vousden K. H. p53: new roles in metabolism // *Trends Cell Biol.* – 2007. – T. 17, № 6. – C. 286-91.
358. Kondoh H., Leonart M. E., Gil J., Wang J., Degan P., Peters G., Martinez D., Carnero A., Beach D. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span // *Cancer research.* – 2005. – T. 65, № 1. – C. 177-185.
359. Hardie D. G. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream // *J Cell Sci.* – 2004. – T. 117, № Pt 23. – C. 5479-87.
360. Budanov A. V., Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling // *Cell.* – 2008. – T. 134, № 3. – C. 451-60.
361. Roche B., Arcangioli B., Martienssen R. Transcriptional reprogramming in cellular quiescence // *RNA Biol.* – 2017. – T. 14, № 7. – C. 843-853.
362. Min M., Spencer S. L. Spontaneously slow-cycling subpopulations of human cells originate from activation of stress-response pathways // *PLoS Biol.* – 2019. – T. 17, № 3. – C. e3000178.
363. Brugarolas J., Lei K., Hurley R. L., Manning B. D., Reiling J. H., Hafen E., Witters L. A., Ellisen L. W., Kaelin W. G., Jr. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex // *Genes Dev.* – 2004. – T. 18, № 23. – C. 2893-904.
364. Ellisen L. Ramsayer KD, Johannessen CM, Yang A, Beppu H, Minda K, Oliner JD, McKeon F, Haber DA // REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell.* – 2002. – T. 10. – C. 995-1005.
365. Newbold K., Partridge M., Cook G., Sohaib S. A., Charles-Edwards E., Rhys-Evans P., Harrington K., Nutting C. Advanced imaging applied to radiotherapy planning in head and neck cancer: a clinical review // *Br J Radiol.* – 2006. – T. 79, № 943. – C. 554-61.

366. Mohan R., Wu Q., Manning M., Schmidt-Ullrich R. 'Radiobiological analysis of fractionation strategies for intensity-modulated radiation treatments of head and neck cancers // *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* – 2000. – T. 46. – C. 619-630.
367. Prasanna A., Ahmed M. M., Mohiuddin M., Coleman C. N. Exploiting sensitization windows of opportunity in hyper and hypo-fractionated radiation therapy // *J Thorac Dis.* – 2014. – T. 6, № 4. – C. 287-302.
368. Chan C., Lang S., Rowbottom C., Guckenberger M., Faivre-Finn C., Committee I. A. R. T. Intensity-modulated radiotherapy for lung cancer: current status and future developments // *J Thorac Oncol.* – 2014. – T. 9, № 11. – C. 1598-608.
369. Baumann P., Nyman J., Hoyer M., Wennberg B., Gagliardi G., Lax I., Drugge N., Ekberg L., Friesland S., Johansson K. A., Lund J. A., Morhed E., Nilsson K., Levin N., Paludan M., Sederholm C., Traberg A., Wittgren L., Lewensohn R. Outcome in a prospective phase II trial of medically inoperable stage I non-small-cell lung cancer patients treated with stereotactic body radiotherapy // *J Clin Oncol.* – 2009. – T. 27, № 20. – C. 3290-6.
370. Fakiris A. J., McGarry R. C., Yiannoutsos C. T., Papiez L., Williams M., Henderson M. A., Timmerman R. Stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small-cell lung carcinoma: four-year results of a prospective phase II study // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* – 2009. – T. 75, № 3. – C. 677-82.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность своим научным руководителям Осипову А.Н. и Леонову С.В. за чуткое руководство, отзывчивость, лояльность и огромный вклад, который они внесли в создание и написание данной работы.

Также благодарю коллектив лаборатории разработки инновационных лекарственных средств и агробιοтехнологий МФТИ, а также лаборатории радиационной биофизики ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, в особенности, Пустовалову М.В. и Чупрова-Неточина Р.Н., моих бессменных напарников в проведении лабораторных исследований, за помощь в осуществлении экспериментальной части и моральную поддержку в процессе моей научной работы. Кроме того, хочу выразить признательность Крючихину В.Е. и Федотову Ю.А. за помощь в облучении клеток.

Искренне благодарю и выражаю свою глубочайшую признательность моим родителям и сестрам за оказываемую поддержку. Без них выполнение данной работы было бы невозможным.