

УДК 577.3

КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И СВЕТА В ПРИСУТСТВИИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА

© 2023 г. С.В. Акулиничев*, **, #, С.И. Глухов*, ***, ##, А.В. Ефременко****, Д.А. Коконцев*, **, Е.А. Кузнецова***, В.В. Мартынова*, А.В. Феофанов****, *****, И.А. Яковлев*, **

*Институт ядерных исследований РАН, Физическая ул., 27, Москва, Троицк, 108840, Россия

**Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Абrikосовский пер., 2, Москва, 119991, Россия

***Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

****Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

*****Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

#E-mail: akulinic@inr.ru

##E-mail: serglukhovmb@gmail.com

Поступила в редакцию 28.06.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 02.08.2023 г.

Исследовано совместное использование рентгеновского облучения и фотодинамической терапии на модели клеток аденокарциномы легкого человека A549. Установлено, что синхронное воздействие двух видов облучения способствует более сильному снижению уровня выживаемости опухолевых клеток, чем их последовательное применение или каждый вид облучения по отдельности. Для различных комбинаций двух указанных видов облучения в клетках определены уровни РНК и экспрессии ряда генов, вовлеченных в контроль клеточного цикла (*p21*, *DINOL*), апоптоз (*BAX*, *PUMA*) и репарацию ДНК (*PARP1*, *OGG1*, *Rad51*, *Lig4*). Наибольший уровень экспрессии при всех воздействиях наблюдался для гена длинной некодирующей РНК *DINOL*. Обнаруженное повышение экспрессии генов *BAX* и *PUMA* свидетельствует о развитии апоптоза. Полученные результаты подтверждают синергизм лучевой и фотодинамической терапии при их синхронном применении.

Ключевые слова: рентгеновское излучение, производные хлорина, фотодинамическая терапия, клетки A549.

DOI: 10.31857/S0006302923050162, EDN: PHMLHS

Лучевая терапия (ЛТ) опухолей является стандартным методом лечения многих видов онкологических заболеваний. Однако часто ее эффективность ограничена из-за радиорезистентности раковых клеток и разной оксигенации участков солидных опухолей, а также из-за ее неизбежного воздействия на опухолевые и нормальные клетки. В качестве альтернативы или дополнения к местной радиотерапии большое значение приобрела фотодинамическая терапия (ФДТ) [1].

Сокращения: ЛТ – лучевая терапия, ФДТ – фотодинамическая терапия, ФС – фотосенсибилизатор, ПЦР – полиморфная цепная реакция, РТА – рентгеновский терапевтический аппарат.

Действие ФДТ основано на образовании в опухолевых клетках, содержащих фотосенсибилизатор (ФС) и облучаемых светом заданной длины волны, активных форм кислорода с высокой цитотоксичностью (синглетный кислород и др.) и малой диффузией, что снижает поражение прилегающих здоровых тканей. В дополнение к высокой конформности, обеспечиваемой концентрацией ФС только в опухолевых клетках, ФДТ характеризуется минимальной приобретенной резистентностью [2]. Более широкому клиническому применению ФДТ, особенно для терапии глуболежащих опухолей, препятствуют проблемы с доставкой света через оптически непрозрачные биологические ткани. Кроме того, эффектив-

ность самостоятельной ФДТ ограничивается аллергическими и другими нежелательными реакциями организма пациента на введенный ФС, а слишком мощное световое воздействие может приводить к перегреву нормальных тканей. Предлагаемые методы доставки света в ткани, например, с помощью использования миниатюрных имплантируемых излучателей [3], пока являются экспериментальными и находятся в стадии разработки. Поэтому в последние годы делались попытки объединить преимущества ФДТ и ЛТ для повышения эффективности лечения новообразований [4]. В ряде работ обнаружено, что комбинация ФДТ и ЛТ позволяет снизить дозу ионизирующего излучения или световой поток и/или концентрацию ФС для достижения того же клинического эффекта, что и при самостоятельной ЛТ или ФДТ [5].

В настоящее время в качестве ФС используются соединения различных классов, например, производные бензопорфирина, цианиновые красители, хлорины и другие [5, 7–9]. Особый интерес представляют ФС на основе производных хлорофилла – хлорины [10]. В клинической практике используются такие препараты на основе хлорина е6, как радахлорин, фотолон и фотодитазин. Синтез новых производных хлорина е6 и их биологическое исследование продолжают до сих пор. Одним из подобных соединений является 3²-(4-метоксифенил)-15²-аспартилхлорин е6 (производное хлорина, названное DYSP-C34), который обладает такими полезными биологическими свойствами как улучшенная растворимость в воде и клеточная проницаемость, таргетное накопление в опухолях и повышенная фототоксичность при облучении низкой световой дозой. Кроме того, было показано, что DYSP-C34 может эффективно накапливаться в подкожной ксенотрансплантатной опухоли мыши и демонстрировать существенную регрессию опухоли после облучения крайне низкой плотностью света [11].

Настоящая работа посвящена исследованию возможной синергии ФДТ и ЛТ на примере монослойной клеточной культуры рака легкого A549, недорогой и доступной модели новообразований человека, и ФС на основе аминоалкиламидного производного хлорина е6.

В работе оценивали клеточный ответ на совместное использование рентгеновского излучения и фотодинамического воздействия по следующим критериям: выживаемость клеток A549 и уровень экспрессии генов, вовлеченных в ответ на генотоксический стресс, начиная от распознавания и ликвидации повреждений ДНК до клеточной гибели. Среди генов репарации ДНК были выбраны для анализа гены *Lig4*, *Rad51*, *Parp1*, *Ogg1*. С учетом уникальности и незаменимости

генов репарации ДНК в разных механизмах репарации такой выбор позволяет оценить вклад каждого механизма репарации ДНК в ликвидацию радиационных повреждений при оценке влияния сочетания ЛТ и ФДТ. Увеличение экспрессии генов репарации происходит, как правило, на третий-шестой час после облучения [12], что может быть обнаружено методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукт гена *Lig4* является эксклюзивным для репарации двухцепочечных разрывов ДНК по каноническому механизму негомологичного соединения концов (с-NHEJ) – главному механизму репарации ДНК в соматических клетках высших эукариот, находящихся в фазах G1/G0 [13]. Продукт гена *Rad51* является уникальным для репарации двухцепочечных разрывов ДНК, направляемой по механизму гомологичной рекомбинации (HRR) – наиболее точному механизму репарации ДНК, более часто реализуемому в фазах S-G2-M [14] и активно транскрибирующихся участках эухроматина [15]. Продукт гена *Ogg1* отвечает за удаление из ДНК 8-оксогуанина, одного из самых распространенных типов окисления оснований ДНК. Продукт гена *Parp1*, хроматиновый белок, является участником координации множества репарационных процессов одноцепочечных разрывов ДНК, эксцизионной репарации нуклеотидов, а также низкоспецифической репарации ДНК по механизмам альтернативного или опосредованного микрогомологией соединения концов (alt-NHEJ и MHEJ соответственно), с-NHEJ и HRR [16].

Анализ активации клеточной гибели в ответ на повреждение ДНК был сосредоточен вокруг сигнального каскада, опосредованного участием гена *p53*. Была проведена оценка активации следующих подконтрольных *p53*-генов: *p21/CDKN1A*, *DINOL*, *PUMA* и *BAX*. Ген *p21/CDKN1A* кодирует ингибитор циклинзависимых киназ, рост его концентрации приводит к остановке клеточного цикла в ответ на многие виды стресса, в том числе и на повреждение ДНК. Продукт гена *DINOL*, длинная некодирующая РНК, является важнейшим компонентом положительной обратной связи в *p53*-зависимой активации процессов поддержания целостности генома. Это реализуется, во-первых, в препятствии транскриптом *DINOL* протеолитической дегградации *p53* при участии MDM-2 (убиквитинлигазы), во-вторых, в усилении связывания *p53* с подконтрольными ему промоторами генов *p21/CDKN1A*, *GADD45A* и многих других генов [17]. Для выявления опосредованной повреждением ДНК апоптотической гибели клеток была оценена экспрессия проапоптотических генов, активируемых генотоксическим стрессом, генов *PUMA* (*p53*-upregulated modulator of apoptosis) и *BAX*. Белковым продуктом гена *PUMA* является ингибитор антиапоптотического

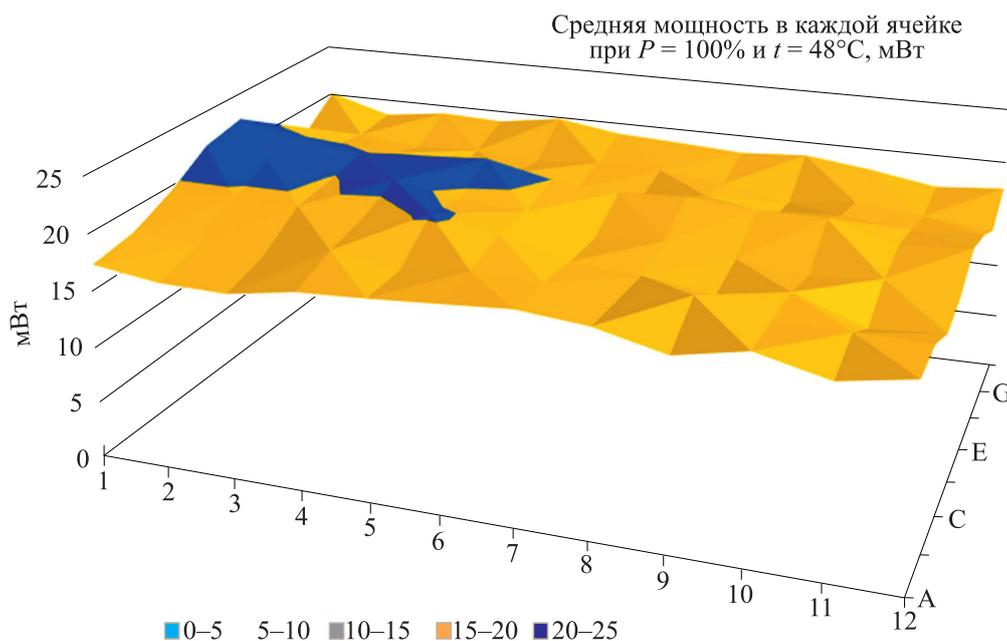


Рис. 1. Распределение мощности света по 96 лункам планшета на длине волны 663 нм.

белка BCL-2. Белковым продуктом гена *BAX* является эффекторный белок апоптоза, активация которого реализуется в образовании пор во внешней мембране митохондрий, сопровождаемым выходом в цитоплазму цитохрома *C*, а также в активации каспаз и собственно запуске апоптотической гибели [18]. Для генов *p21/CDKN1A*, *DINOL*, *PUMA*, *BAX* увеличение экспрессии происходит прямо пропорционально уровню генотоксического воздействия, что не всегда наблюдается для генов контроля клеточного цикла и апоптоза [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источник ионизирующего излучения. В качестве источника ионизирующего излучения использован клинический близкофокусный рентгенотерапевтический аппарат РЕНТГЕН-ТА-02 (РТА) производства ООО «Севкаврентген-Д» (Россия). Максимальное напряжение на трубке этого аппарата составляет 100 кВ, однако в работе использовали рентгеновское излучение при напряжении 60 кВ, которое ближе к видимому свету по глубине проникновения в тканях. Дозу облучения подбирали путем изменения тока аппарата и длительности облучения так, чтобы время набора дозы рентгеновским излучением и время облучения светом совпадали. Это дает возможность реализовать полностью синхронное воздействие рентгена и света. Дозиметрию ионизирующего излучения проводили двумя независимыми методами: с использованием миниатюрной ионизационной камеры 34013 (PTW, Германия) с электрометром

MULTIDOS (PTW, Германия) и радиохромной пленки EBТ2 и EBТ-XD (Gafchromic, США). Дозу в выбранном режиме сначала измеряли с ионизационной камерой в твердотельном фантоме, симулирующем планшет с клетками, а затем — с помощью пленок при их размещении непосредственно над и под планшетом или чашкой Петри с клетками. При этом значение поглощенной клетками дозы определяли как среднее между показаниями пленок, расположенных над и под планшетом или чашкой Петри.

Источник излучения света и фотосенсибилизатор. Для исследования фотодинамических эффектов в клеточной культуре, а в дальнейшем и в живых организмах, разработан и изготовлен световой облучатель, позволяющий подводить свет строго заданной длины волны к биологическим образцам одновременно с рентгеновским или другим ионизирующим излучением. Источник излучения света выполнен на основе 24-х светодиодов (мощность каждого — 2 Вт) с регулируемой длиной волны в диапазоне 658–665 нм. Для лабораторного 96-луночного планшета плотность мощности света составляла 80 мВт/см^2 . Измерения спектра света проводили с использованием спектрометра ASP-150 («Авеста-Проект», Россия), а плотность светового потока измеряли с использованием сенсорного прибора на основе термoelementa S425C (Thorlabs, США). Пример измеренного распределения мощности света по лункам 96-луночного планшета показан на рис. 1. При обработке результатов использовали лунки с отклонением мощности света не более 15%. Дли-

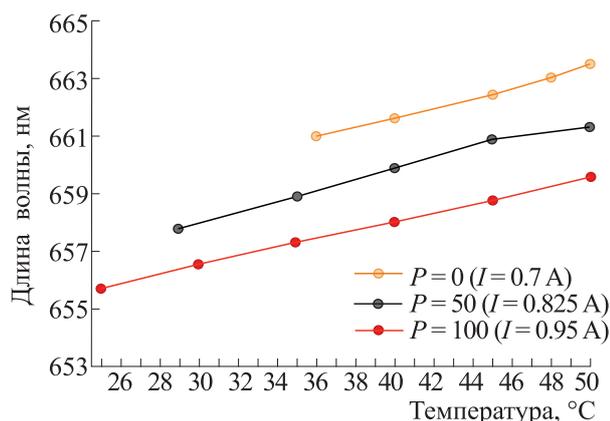


Рис. 2. Зависимость длины волны света от температуры диодов и тока, задаваемого параметром мощности излучателя P .

на волны светового излучения определяется температурой диодов и подаваемым на них током, задаваемым параметром мощности (P) излучателя (рис. 2).

В качестве ФС был использован раствор аминоалкиламида хлорина е6 (AAE6) в 5%-й эмульсии кремофора EL [20–22]. Спектр поглощения в 1%-й эмульсии раствора кремофора EL (CrEL) представлен на рис. 3. Максимум Q-полосы поглощения находится на длине волны 663 нм, что соответствует длине волны использованного излучателя при температуре диодов 47–48°C при максимальной мощности излучателя (рис. 2). Близкий по свойствам ФС был использован в предыдущих исследованиях сочетанной терапии ФДТ и ЛТ [8] и показал свою высокую эффектив-

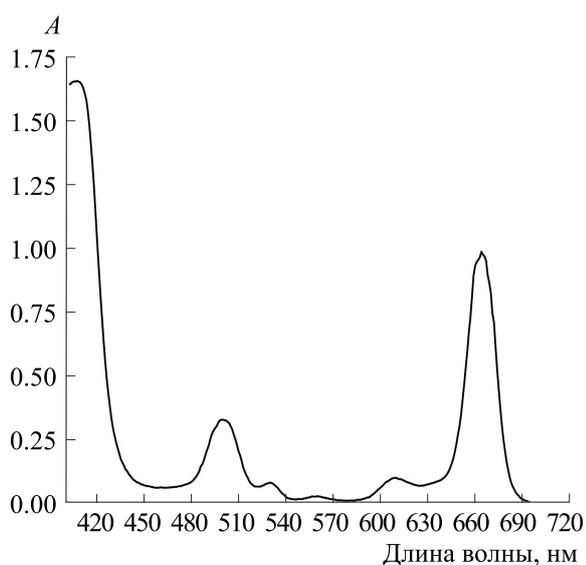


Рис. 3. Спектр поглощения AAE6 в 1%-м CrEL.

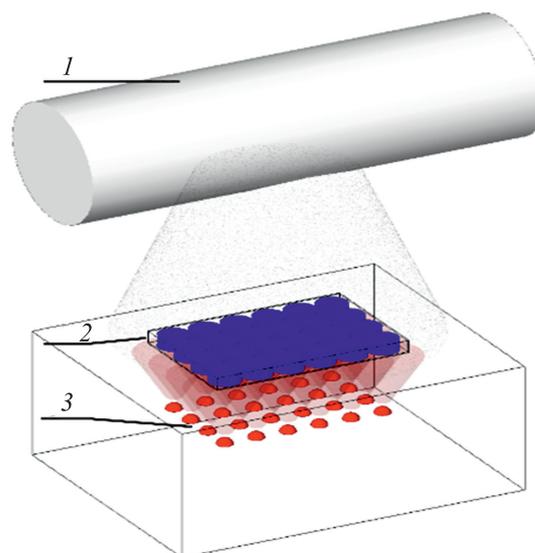


Рис. 4. Принципиальная схема установки для сочетания воздействия ФДТ и РТА на примере облучения 24-луночного планшета с клетками: 1 – трубка РТА, 2 – планшет с клетками, 3 – излучатель света.

ность. Аналогичные виды ФС исследовались и в других работах [10, 23, 24].

Общая схема эксперимента показана на рис. 4. Воздействие на клетки осуществлялось либо самостоятельно (РТА или ФДТ), либо последовательно (РТА → ФДТ или ФДТ → РТА), либо одновременно (РТА+ФДТ). Преимуществом использованного оборудования является возможность синхронного воздействия света и ионизирующего излучения на клетки или на другой биологический материал. Эксперимент проводили в каньоне для рентгеновской терапии, поэтому все управление излучателями проводилось дистанционно с использованием кабелей длиной около 10 м.

Клеточная линия и условия выращивания клеток. В экспериментах использовали клетки аденокарциномы легкого человека A549 (получены из ИБХ РАН, Москва). Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 35 мм в концентрации 1.5×10^5 клеток в чашке в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 4 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), антибиотика (пенициллин-стрептомицин, 250 ЕД, «ПанЭко», Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Аргентина). Перед посевом культуру клеток проверяли на количество живых/мертвых клеток с красителем трипановым синим [25]. Как правило, количество мертвых клеток в экспериментах не превышало 3%.

Облучение клеток. Клетки A549 облучали в полной среде (2 мл) в закрытых чашках Петри. Воздействие рентгеновскими лучами проводили

в дозе 6 Гр. Воздействие светом в присутствии ФС на клетки осуществляли в течение 200 с в дозе 5 Дж/см². Предварительно раствор ФС в концентрации 0.1 мкМ был приготовлен в полной среде из 1.6 мМ стокового раствора (в 5%-й эмульсии кремифора EL). В чашке Петри с клетками 1 мл среды заменяли на свежеприготовленный раствор ФС, при этом конечная концентрация ФС составила 0.05 мкМ. После облучения клетки инкубировали 1–24 ч в стандартных условиях.

Клоногенный тест. После облучения клетки культивировали в инкубаторе 1 ч в стандартных условиях, затем каждую чашку промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера, буфер полностью удаляли и добавляли 0.5 мл 0.25%-го трипсина. Далее чашки инкубировали 15 мин. Каждую чашку проверяли под микроскопом на факт полного открепления клеток. Клетки ресуспендировали в 4 мл среды и переносили в пятимиллилитровые пробирки типа Эппендорф, далее центрифугировали при 1400 g в течение 5 мин. При подсчете клеточной суспензии в камере Горяева и проверке на наличие поврежденных клеток с трипановым синим мертвые клетки не были обнаружены. Клетки высевали в чашки Петри диаметром 35 мм (SPL Lifesciences, Южная Корея) в концентрации 300 клеток/чашку, в такой же концентрации высевали контрольные клетки. Все колонии выращивали в течение одной недели после воздействия, затем проводили их подсчет. Окрашивание и фиксацию колоний проводили с помощью 57%-го этанола и 0.5%-го бриллиантового зеленого в течение получаса.

Консервация клеток и анализ уровня РНК. Клетки в чашках Петри после облучения подвергали консервации в растворе IntactRNA (Евроген, Россия). Для этого полная клеточная среда (DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки) заменялась на DMEM без эмбриональной телячьей сыворотки (согласно рекомендациям производителя IntactRNA), далее среда удалялась и заменялась на 1 мл раствора IntactRNA на чашку Петри. Дальнейшие инкубации проводились по методике производителя (1 ч при комнатной температуре, 24 ч при +4°C, далее до момента анализа при –20°C). Облученные и необлученные (контрольные) клетки в реагенте IntactRNA хранили при –20°C менее 2 месяцев. Перед выделением РНК консервант IntactRNA удалялся, клетки промывались от избытка консерванта в фосфатно-солевом буфере. Лизис клеток производили с использованием реагента на основе кислого фенола и гуанидина тиоцианата ExtractRNA (Евроген, Россия). Очистку РНК из фенольного раствора производили с помощью набора Direct-zol RNA Microprep (Zymo Research, США), включая удаление примесей геномной ДНК в реакции с ДНКазой I. Концентрацию РНК определяли в ре-

акции с интеркалирующим красителем с использованием набора RNA BR на флуориметре Qubit (Thermo Scientific, США).

Обратная транскрипция и количественная полимеразная цепная реакция. Синтез кДНК проводили с помощью случайного гексамерного праймера в реакции обратной транскрипции с ферментом M-MLV -RH («Biolabmix», Россия) в присутствии ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific, США). ПЦР в реальном времени проводили с использованием Hot Start Taq DNA polymerase («Biolabmix», Россия) с детекцией продуктов по накоплению флуоресценции SybrGreen I. Программа ПЦР: 1×(94°C – 4'45"); 42×(92°C – 15", 60°C – 15", 72°C – 10" – детекция флуоресценции в канале SybrGreen/FAM). Качество реакций контролировали по кривым плавления. Праймеры к целевым генам, подобранные в процессе работы, приведены в табл. 1. Относительное усиление экспрессии на уровне мРНК определяли по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [26]. В качестве нормировочного гена был взят ген *GAPDH*.

Статистический анализ. Анализ статистической достоверности отличий проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), расчет *p*-value достоверности уровня значимости проводили методом последующего теста Туки [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определяли выживаемость клеток (клоногенный тест) при отдельном или синхронном воздействии ЛТ и ФДТ, эти результаты представлены на рис. 5. Как видно из рис. 5, выживаемость клеток существенно снижалась при самостоятельном воздействии рентгеновского или фотодинамического облучения, в то время как при их синхронном воздействии образование колоний совсем не выявлялось, что говорит о полной гибели клеток в данных условиях эксперимента.

Определение концентрации РНК было проведено в образцах, полученных в двух разделенных по времени на несколько месяцев сеансах облучения. Во время каждого сеанса были облучены по два обособленных биологических образца для каждого режима. Концентрация РНК была определена в равных по объему образцах, взятых из однотипно засеянных чашек Петри в рамках каждого из сеансов облучения. Результаты показали, что в течение 6–24 ч после фотоиндуцированного и лучевого воздействия в клетках A549 происходит значительное снижение концентрации РНК как при последовательном, так и при синхронном применении ЛТ и ФДТ (рис. 6). При этом концентрация РНК в клетках при последовательном воздействии ЛТ и ФДТ выше, чем при синхронном облучении в каждом соответствующем вре-

Таблица 1. Праймеры, подобранные к целевым генам

№	Ген	Прямой праймер 5' → 3'	Обратный праймер 5' → 3'
1	<i>BAX</i>	TTCTGACGGCAACTTCAACTG	AATGTCCAGCCCATGATGGTTC
2	<i>DINOL</i>	TGGGAGAGGTGACCTAGTGAG	ACTCTGGCAGGCAAGGATTTAC
3	<i>GAPDH</i>	TTCAACAGCGACACCCACTC	TGGTCCAGGGGTCTTACTCC
4	<i>HPRT1</i>	ATTGTAGCCCTCTGTGTGCTC	TACTTTTATGTCCCCTGTTGACTG
5	<i>LIG4</i>	ACTCCCTGGAAGTGTATTGCC	TGTGAGGCAGCCATCAAAGC
6	<i>OGG1</i>	ACTGTATCACCCTGGGGTTC	CAGTGATGCGGGCGATGTTG
7	<i>p21</i>	AGGGGACAGCAGAGGAAGAC	AGAAGATCAGCCGGCGTTTG
8	<i>p53</i>	GTGAGCGCTTCGAGATGTTC	ATGGCGGGAGGTAGACTGAC
9	<i>PARP1</i>	TGTCCCAGGGTCTTCGGATAG	AGACGTATGGCAGTAGTTGGC

менном периоде. Облучение клеток A549 только с помощью РТА приводит к снижению РНК на ~20%, в то время как синхронное облучение снижает уровень РНК приблизительно в 9 раз. Значительное падение определяемой концентрации РНК говорит о наибольшем поражении РНК

именно при синхронном воздействии ФДТ и РТА.

Анализ генов контроля клеточного цикла и апоптоза показал, что после последовательного и синхронного воздействий ФДТ и ЛТ на клетки A549 в них наблюдается существенный рост экс-

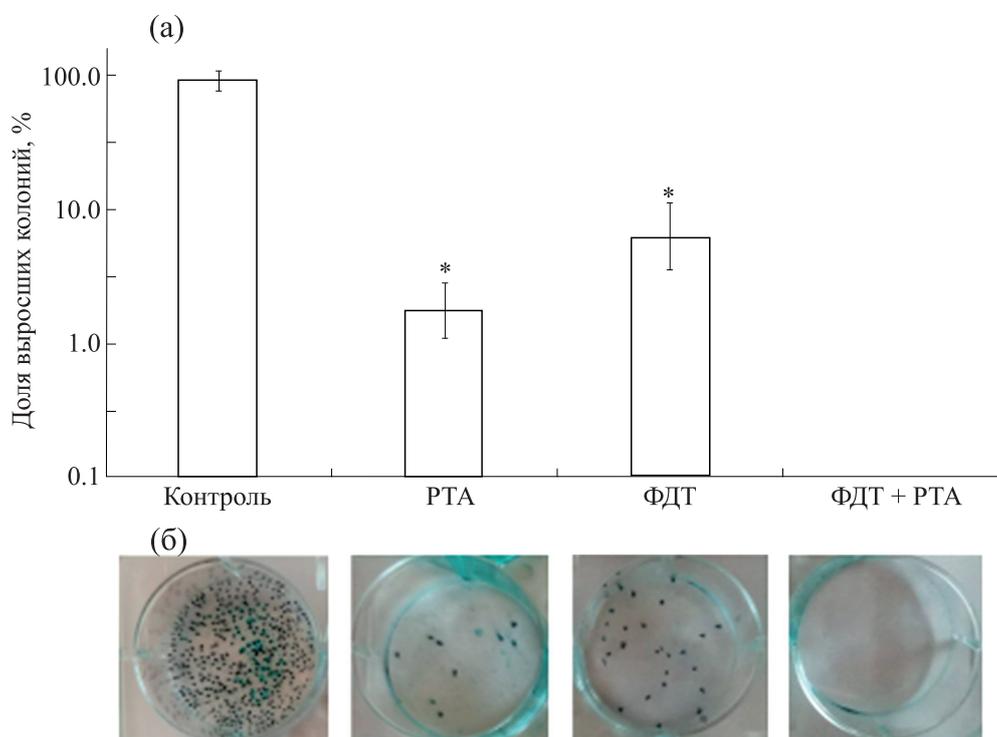


Рис. 5. Выживаемость (а) и фото чашек Петри с колониями (б) клеток A549 после самостоятельного и синхронного воздействия рентгеновского излучения и света в присутствии ФС (значения и погрешности на графике представлены как $M \pm SD$); * – выделены достоверные отличия от контроля, $p < 0.05$.

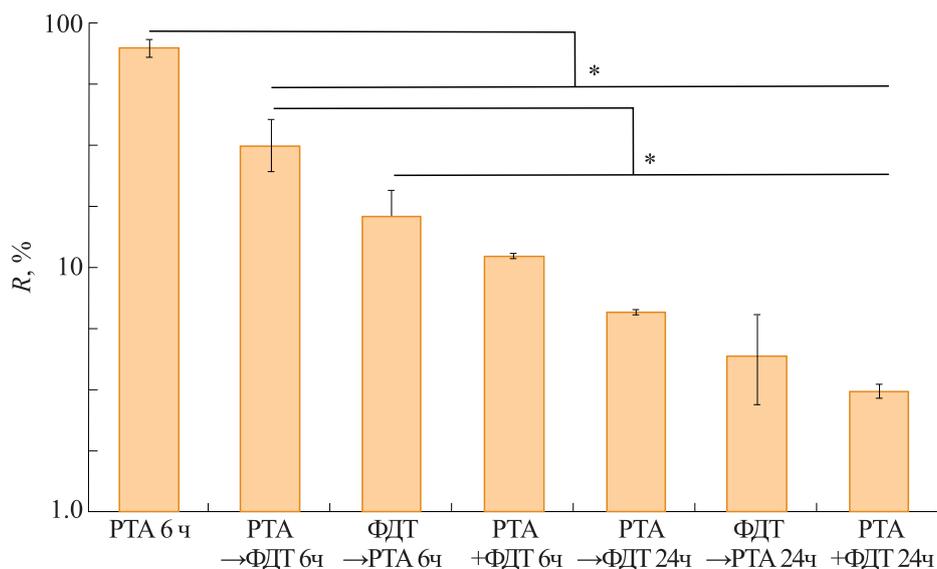


Рис. 6. Уровни РНК при самостоятельном (РТА или ФДТ), последовательном (РТА → ФДТ и ФДТ → РТА) и синхронном (РТА+ФДТ) воздействии рентгеновского излучения и света в присутствии ФС на клетки А549. R – отношение в % количества РНК для облученных образцов к аналогичным уровням в необлученных образцах (показаны значения и погрешности в виде $M \pm SD$); * – отмечены достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$.

прессии генов *p21*, *DINOL*, *PUMA*, *BAX* уже к шестому часу после воздействия, этот рост продолжается до 24 часов (рис. 7). Обнаружено, что для гена *p53*, а также для большинства генов репарации ДНК *PARP1*, *RAD51* и *Ogg1* уровень экспрессии при разных режимах облучения практически не менялся. Наблюдалась некоторая тенденция к увеличению экспрессии гена *RAD51* к 6 ч и *PARP1* к 24 часам при всех вариантах синхронного воздействия. Для гена *Ogg1*, наоборот, наблюдалось некоторое снижение уровня экспрессии со временем. Экспрессия гена *HPRT1* приведена для сравнения экспрессии второго нормировочного гена, используемого наряду с *GAPDH* в исследованиях. Из сопоставления всех результатов экспрессии генов репарации следует, что наибольшая активация наблюдалась для гена *Lig4*. Это вполне соответствует тому, что данный ген вовлечен в наибольшее число процессов репарации по механизму с-ННЕJ в соматических клетках эукариот, находящихся преимущественно в фазах G1/G0 клеточного цикла, когда этот механизм репарации ДНК имеет доминирующее значение.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследована возможность получения синергического эффекта при воздействии двух видов облучения, используемых в терапии злокачественных новообразований, – воздействия света в присутствии ФС и ионизирующего (рентгеновского) излучения. Облучение проводили в разных режимах – самостоятельно или последовательно ФДТ и РТА и синхронно ФДТ + РТА.

При последовательном воздействии концентрация РНК заметно снижалась по сравнению с самостоятельным воздействием, однако ее уровень был все равно заметно выше, чем при синхронном воздействии (рис. 6). Значительная деградация РНК не позволила провести даже фрагментарный ПЦР-анализ для трех из четырех образцов, полученных через 24 ч после синхронного воздействия ФДТ и РТА. Избранная схема количественной ПЦР требовала наличия целостных фрагментов целевой РНК длиной хотя бы в 300 нуклеотидов (так как был использован случайный гексамерный праймер вместо олиго-дТ в реакции синтеза кДНК). Дизайн праймеров был подобран для получения продуктов ПЦР длиной не более 250 нуклеотидов. Это еще раз свидетельствует об особенно сильном воздействии синхронного облучения.

Как правило, ген *p53* не меняет своей экспрессии на уровне мРНК, так как в основном его активность регулируется за счет протеолиза, посттрансляционных модификаций, тетрамеризации и связывания с промоторами подконтрольных генов [28]. Однако для мишеней белка *p53*, для которых свойственна активация экспрессии в ответ на генотоксический стресс (*CDKN1A*, *DINOL*, *BAX*, *PUMA*), показана существенная активация в ответ на комбинированное воздействие ФДТ и РТА. Уменьшение уровня РНК в совокупности с ростом экспрессии генов *Lig4* и *DINOL* свидетельствуют о мощном генотоксическом эффекте примененных воздействий. Известно, что *DINOL* усиливает экспрессию примерно в 100 раз в пер-

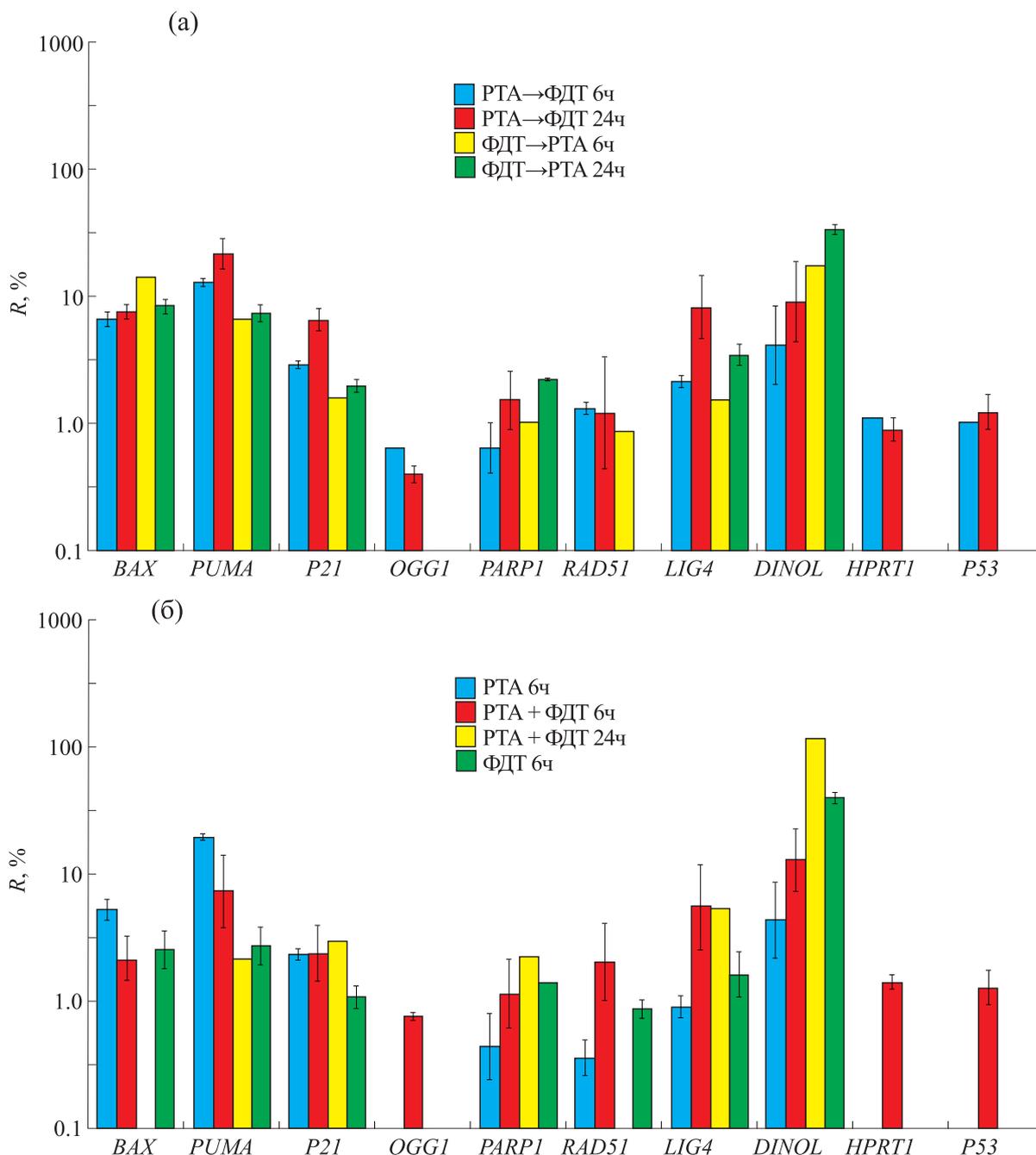


Рис. 7. Уровни экспрессии генов *BAX*, *PUMA*, *p21*, *Lig4*, *DINOL*, *PARP1*, *Rad51*, *OGG1*, *p53* и *HPRT1* в клетках A549 при самостоятельном, последовательном и синхронном воздействии рентгеновского излучения и света в присутствии ФС. *R* – отношение в % уровней экспрессии генов для облученных образцов к аналогичным уровням в необлученных образцах.

вичных фибробластах человека в ответ на повреждение ДНК, вызванное доксорубицином (генотоксическим химиотерапевтическим агентом), достигая пика через 10–24 ч после воздействия [17]. Тем не менее, известный ген-мишень *p53* *CDKN1A* (*p21*) в тех же условиях активируется только в 5–10 раз. В наших экспериментах наблюдалась похожая тенденция опережения уров-

ня экспрессии *DINOL* над *CDKN1A*. Обнаруженное значительное повышение экспрессии *p21*, *DINOL* и вовлеченных в апоптоз генов *BAX* и *PUMA* может также свидетельствовать о существенном повреждении ДНК облученных клеток и развитии апоптоза под контролем механизма, опосредованного работой *p53*. Экспрессия *DINOL*, *BAX*

и *PUMA* также была высокой при воздействии только самостоятельной РТА или ФДТ.

Выживаемость клеток существенно снижалась при воздействии обоих видов облучения в отдельности, а при их синхронном воздействии образование колоний практически не выявлялось. Это свидетельствует о существенном повреждающем воздействии именно синхронного режима ФДТ+РТА. Существенно худшее состояние РНК после синхронного воздействия РТА и ФДТ, что следует из невозможности провести даже фрагментарный ПЦР анализ кДНК, вероятнее всего обусловлено пролонгированным окислительным стрессом, возникающим под действием ионизирующего излучения и поддерживающимся на протяжении нескольких суток после облучения по причине, очевидно, дисфункции митохондрий, генерации и диффузии из митохондриального пространства во внутриклеточное большое количества непогашенных активных форм кислорода [29]. Исходя из полученных результатов для выживаемости, экспрессии генов и обнаруженной деградации РНК, можно сделать вывод, что наибольшее поражающее клетки воздействие оказывает синхронное облучение, что подтверждает синергизм ФДТ и ЛТ именно при их совместном воздействии.

Таким образом, полученные результаты по активации генов репарации ДНК и запуску апоптоза под контролем *p53* соответствуют динамике развития постлучевой гибели клеток при разных комбинациях воздействия ФДТ и ЛТ. В совокупности с фактором деградации РНК данные по экспрессии генов и клеточной гибели свидетельствуют о большем поражающем эффекте синхронной комбинации ФДТ и ЛТ по сравнению с их последовательным применением.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю благодарность д.б.н. М.Г. Шарипову, С.И. Державину, А.А. Игнатовой, Д.Н. Мамонову и Г.В. Мерзликину за помощь в проведении экспериментов, а также М.А. Грину за предоставление фотосенсибилизатора для исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-02-00102 «Исследование эффективности синхронной фотодинамической и лучевой терапии»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. He, X. Yu, and W. Li, *ACS Nano*, **16** (12), 19691 (2022). DOI: 10.1021/acsnano.2c07286
2. A. Bansal, F. Yang, T. Xi, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115** (7), 1469 (2018). DOI: 10.1073/pnas.1717552115
3. Y. Fatma and T. Ayça, *Nov. Appro. in Can. Study*, **1** (2), 000506 (2018). DOI: 10.31031/NACS.2018.01.000506
4. A. Colasanti, A. Kisslinger, M. Quarto, et al., *Acta Biochim. Pol.*, **51** (4), 1039 (2004).
5. A. R. Montazerabadi., A. Sazgarnia, M. H. Bahreyni-Toosi, et al., *J. Photochem Photobiol B*, **109**, 42 (2012). DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.01.004
6. B. W. Pogue, J. A. O'Hara, E. Demidenko, et al., *Cancer Res.*, **63** (5), 1025 (2003).
7. М. А. Каплан, А. И. Малыгина, Г. В. Пономарев и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **14**, 79 (2015).
8. Ю. С. Романко, А. Ф. Цыб, М. А. Каплан и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **139** (4), 456 (2005).
9. D. Xu, A. Baidya, K. Deng, et al., *Oncol. Rep.*, **45** (2), 547 (2021). DOI: 10.3892/or.2020.7871
10. A. Hak, M. S. Ali, S. A. Sankaranarayanan, et al., *ACS Appl. Bio Mater.*, **6** (2), 349 (2023). DOI: 10.1021/acsubm.2c00891
11. L. Wang, G. Li, L. Cao, et al., *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **5** (2), 110 (2022). DOI: 10.1021/acspstsci.1c00249
12. J. S. Russell, K. Brady, W. E. Burgan, et al., *Cancer Res.*, **63** (21), 7377 (2003).
13. H. H. Y. Chang, N. R. Pannunzio, N. Adachi, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **18** (8), 495 (2017). DOI: 10.1038/nrm.2017.48
14. K. Tsouroula, A. Furst, M. Rogier, et al., *Mol. Cell*, **63** (2), 293 (2016). DOI: 10.1016/j.molcel.2016.06.002
15. F. Aymard, B. Bugler, C. K. Schmidt, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21** (4), 366 (2014). DOI: 10.1038/nsmb.2796
16. A. Ciccia and S. J. Elledge, *Mol. Cell*, **40** (2), 179 (2010). DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.019
17. A. M. Schmitt, J. T. Garcia, T. Hung, et al., *Nat. Genet.*, **48** (11), 1370 (2016). DOI: 10.1038/ng.3673
18. M. P. A. Luna-Vargas and J. E. Chipuk, *Trends Cell Biol.*, **26** (12), 906 (2016). DOI: 10.1016/j.tcb.2016.07.002
19. H. Rezaeejam, A. Shirazi, M. Valizadeh, et al., *J. Cancer Res. Ther.*, **11** (3), 549 (2015). DOI: 10.4103/0973-1482.160912
20. М. А. Грин, И. С. Лонин, С. В. Федунин, et al., *Mendeleev Commun.*, **17**, 209 (2007).
21. A. V. Efremenko, A. A. Ignatova, A. A. Borsheva, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11** (4), 645 (2012).
22. A. V. Efremenko, A. A. Ignatova, M. A. Grin, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **13**, 92 (2014).
23. Г. В. Пономарев, *Рос. биотерапевтич. журн.*, **6** (1), 24 (2007).
24. Г. В. Пономарев, С. Ю. Егоров, А. А. Стрижаков и др., *Рос. биотерапевтич. журн.*, **12** (2), 68 (2013).

25. И. А. Кондратьева, Н. В. Воробьева, О. В. Буракова и др., в кн. *Практикум по иммунологии*, под ред. И. Кондратьева и В. Самуилова (Изд. МГУ, М., 2001), сс. 17–32.
26. K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods*, **25** (4), 402 (2001), DOI: 10.1006/meth.2001.1262
27. J.W. Tukey, *Biometrics*, **5** (2), (1949).
28. A. Hafner, M. L. Bulyk, A. Jambhekar, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20** (4), 199 (2019), DOI: 10.1038/s41580-019-0110-x
29. S. Kobashigawa, K. Suzuki, and S. Yamashita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414** (4), 795 (2011), DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.006

Cellular Response to Exposure to Ionizing Radiation and Light in the Presence of a Photosensitizer

S.V. Akulinichev*, **, S.I. Glukhov*, ***, A.V. Efremenko****, D.A. Kokontsev*, **, E.A. Kuznetsova***, V.V. Martynova*, A.V. Feofanov****, *****, and I.A. Yakovlev*, **

**Institute for Nuclear Research, Russian Academy of Sciences, Fizicheskaya ul. 27, Troitsk, Moscow, 108840 Russia*

***B.V. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Abrikosovskii per. 2, Moscow, 119991 Russia*

****Institute for Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*****Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

******Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

This study has been conducted to investigate the effects of X-ray irradiation in combination with photodynamic therapy on human lung adenocarcinoma cell line A549 used as a lung cancer model. It has been established that the concomitant use of these two types of radiation leads to much lower survival rate of tumor cells than that observed after the sequential use of these types of radiation or exposure to each type of radiation measured separately. For different combinations of the two mentioned types of radiation, the mRNA expression levels of some genes involved in cell cycle regulation (*p21*, *DINOL*), apoptosis (*BAX*, *PUMA*), and DNA repair (*PARP1*, *OGG1*, *Rad51*, *Lig4*) were determined in cells. The highest level of expression after exposure to different combinations of radiation was observed for the lncRNA *DINOL* gene. The increased expression of the *BAX* and *PUMA* genes indicates the development of apoptosis. The results obtained confirm that there is synergism in X-ray radiation and photodynamic therapy due to the concomitant use of these types of radiation.

Keywords: X-rays, chlorine derivatives, photodynamic therapy, A549 cells