

Д.В. Молодцова, Н.Ю. Воробьева, Л.И. Яшкина, Т.М. Трубченкова, Д.В. Гурьев, А.Н. Осипов

ПОВЫШЕННАЯ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Дарья Викторовна Молодцова, e-mail: dmolodtsova@gmail.com

РЕФЕРАТ

Цель: Оценка радиочувствительности клеток немелкоклеточного рака легкого человека (НМРЛ), выживших и давших устойчивый рост после воздействия цисплатина.

Материал и методы: В работе использовали клеточную линию НМРЛ А549, которую подвергали четырехкратному воздействию цисплатина в концентрации 2,5 мкг/мл для получения клеточной популяции, выживающей и дающей устойчивый рост после воздействия цисплатина, далее клетки А549Рt. Облучение клеток проводили на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) при мощности дозы 0,85 Гр/мин. Оценка клеточной гибели проводили с помощью проточной цитометрии. Для анализа эффективности репарации ДНК от двуниевых разрывов (ДР) использовали количественную оценку фокусов белков-маркеров ДР ДНК γ H2AX и 53BP1.

Результаты: Выжившие и давшие устойчивый рост после воздействия цисплатина клетки НМРЛ А549Рt характеризуется пониженной активацией апоптоза и образованием меньшего количества 53BP1 в ответ на дополнительное воздействие цисплатина по сравнению с исходными клетками А549. А549Рt также проявляют резистентность к воздействию рентгеновского излучения, проявляющуюся в снижении количественного выхода фокусов белков-маркеров ДР ДНК γ H2AX и 53BP1.

Заключение: Выявленная в ходе работы резистентность клеток А549Рt к воздействию ионизирующего излучения может существенно снижать эффективность неадьювантной химиолучевой терапии злокачественных новообразований. Необходимы дальнейшие исследования по выявлению детальных клеточно-молекулярных механизмов приобретённой в ходе химиотерапии устойчивости выживших клеток к лучевой терапии. В будущем это позволит увеличить эффективность лечения злокачественных новообразований и избежать рецидивов.

Ключевые слова: γ H2AX, 53BP1, радиорезистентность, остаточные фокусы, двуниевые разрывы ДНК, рентгеновское излучение, цисплатин

Для цитирования: Д.В. Молодцова, Н.Ю. Воробьева, Л.И. Яшкина, Т.М. Трубченкова, Д.В. Гурьев, Осипов А.Н. Повышенная радиорезистентность клеток немелкоклеточного рака легкого человека после воздействия цисплатина // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 4. С. 20–24. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-20-24

D.V. Molodtsova, N.Yu. Vorobyeva, L.I. Yashkina, T.M. Trubchenkova, D.V. Guryev, A.N. Osipov

Increased Radioresistance of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Surviving Cisplatin Exposure

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: D.V. Molodtsova, e-mail: dmolodtsova@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: To evaluate radioresistance of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells that survived and showed sustained growth after exposure to cisplatin.

Material and methods: The work used the NSCLC cell line A549, which was exposed to cisplatin at a concentration of 2.5 μ g/ml four times to obtain a cell population that survives and produces stable growth after exposure to cisplatin, A549Pt. Cell irradiation was carried out on a RUB RUST-M1 X-ray biological installation (Russia) at a dose rate of 0.85 Gy/min. Cell death was assessed using flow cytometry. To analyze the effectiveness of DNA repair from double-strand breaks (DSBs), we used a quantitative assessment of the foci of DNA DSB marker proteins γ H2AX and 53BP1.

Results: A549Pt NSCLC cells that survived and grew robustly after exposure to cisplatin exhibited reduced activation of apoptosis and produced less 53BP1 in response to additional cisplatin exposure compared to parental A549 cells. A549Pt also exhibit resistance to X-ray radiation, manifested in a decrease in the quantitative yield of foci of DNA DSB marker proteins γ H2AX and 53BP1. The resistance of A549Pt cells to the effects of ionizing radiation, revealed in this work, can significantly reduce the effectiveness of neoadjuvant chemoradiation therapy for malignant neoplasms. Further research is needed to identify the detailed cellular and molecular mechanisms of the resistance of surviving cells to radiation therapy acquired during chemotherapy. In the future, this will increase the effectiveness of treatment of malignant neoplasms and avoid relapses.

Keywords: γ H2AX, 53BP1, radioresistance, residual foci, DNA double-strand breaks, X-ray irradiation, cisplatin

For citation: Molodtsova DV, Vorobyeva NYu, Yashkina LI, Trubchenkova TM, Guryev DV, Osipov AN. Increased Radioresistance of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Surviving Cisplatin Exposure. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(4):20–24. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-20-24

Введение

Химио-, лучевая и химиолучевая терапия на сегодняшний день являются одними из основных способов лечения злокачественных новообразований [1]. Однако гетерогенность клеточной популяции в опухолевой ткани является одним из важнейших препятствий их терапии с использованием химиопрепаратов и ионизирующего излучения. Гетерогенность опухолевых клеток по морфологическим и функциональным признакам (в том числе по чувствительности к радиационным и химическим воздействиям) является фундаментальным свойством злокачественных новообразований и определяет эффективность лечения злокачественных новообразований [2–4]. Присутствие резистентных клеток приводит к неудачам терапии злокачественных новообразований и рецидивам заболевания. Химиотерапия может проводиться одновременно или последовательно до (неoadьювантная) или после (адьювантная) основного лечения (хирургического вмешательства или лучевой терапии). При последовательной химиолучевой терапии неудача может быть связана с перекрестной резистентностью клеток как к радиационным, так и химическим воздействиям.

Радио- и химиорезистентность представляют собой два разных фенотипа, и их взаимодействие очень сложное: в некоторых случаях они обеспечивают защитные эффекты при последующей химиотерапевтическом или радиационном воздействии, а в других случаях усиливают повреждающие эффекты. Имеются данные о том, что химиорезистентные раковые клетки также становятся устойчивыми к воздействию ионизирующего излучения [5–10]. В клетках рака яичников перекрестной резистентности способствует повышенное содержание глутатиона, поскольку ингибирование глутатиона с помощью бутионинсульфоксимида сенсibiliзирует цисплатин-резистентные клетки к воздействию ионизирующего излучения [6, 11]. Лучшая выживаемость клеток глиомы, устойчивых к цисплатину, после дополнительного облучения предполагает повышенную эффективность систем репарации ДНК в этих клетках [8]. В связи с вышеизложенным, характеристика и выявление молекулярно-клеточных особенностей химио- и радиорезистентных клеток различных опухолей является актуальной задачей современной онкологии.

Цель исследования – оценка радиочувствительности клеток немелкоклеточного рака легкого человека (НМРЛ), выживших и давших устойчивый рост после воздействия цисплатина.

Для оценки эффективности репарации ДНК использовали иммуоцитохимическую оценку остаточных (регистрируемых через 24 ч и большее время после облучения) фокусов белков маркеров ДР ДНК – γ H2AX и 53BP1. Считается, что наличие остаточных фокусов белков маркеров ДР ДНК свидетельствует о невозможности завершения процесса репарации ДНК и наличии летальных повреждений ДНК [12–14].

Материал методы

Культура клеток

В работе использовали клеточную линию НМРЛ A549 (ATCC CRM-CCL-185). Клетки культивировали в питательной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (ПанЭко, Россия) с аланил-глутаминном, 25000 ед/фл пенициллина, 50 мг/фл стрептомицина (Биолот, Россия) и 10 % фетальной бычьей сыворотки (HyClone Cytiva, США). Культивирование клеток проводили в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37 °C, 5 % CO₂, насыщенная влажность).

Инкубация с цисплатином

Для получения выживших клеток исходные клетки четырехкратно инкубировали в среде, содержащей 2,5 мкг/мл цисплатина (Тева, Россия) в течение 1 часа (1 раз в неделю с перерывом в 6 суток) по аналогии с клиническим назначением с учетом свободной концентрации цисплатина в крови 2,25 мкг/мл при быстрой инфузии 40 мг/м² препарата 1 час [15]. После последней дозы клетки инкубировали до появления активно делящихся клеток, которые и характеризовали. Этим клеткам было присвоено условное название A549Pt. Для сравнительной оценки чувствительности к дополнительному воздействию цисплатина исходные клетки и A549Pt подвергали воздействию цисплатина в концентрации 2 или 4 мкг/мл в течение 24 ч.

Облучение

Облучение клеток проводили на рентгеновской установке РУСТ-М1 (ООО «Диагностика-М», Москва, Россия), оснащенной двумя рентгеновскими излучателями, с мощностью дозы 0,85 Гр/мин (напряжение 200 кВ, анодный ток 2×5 мА и алюминиевый фильтр 1,5 мм).

Имуоцитохимия

Клетки фиксировали на покровных стеклах в 4 % параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 20 минут при комнатной температуре с последующим двойным промыванием фосфатно-солевым буфером (PBS) и пермеабиллизацией в 0,3 % тритоне-X100 (в фосфатно-солевом буфере, рН 7,4), дополненном 5 % сыворотки козы для блокирования неспецифического связывания антител в течение 60 мин. Затем клетки инкубировали в течение ночи при 4 °C с первичными моноклональными антителами кролика против γ H2AX (фосфо S139) (разведение 1:800, клон EP854(2)Y, Abcam, Waltham, MA, США) или первичными моноклональными антителами мыши против 53BP1 (разведение 1:400, клон BP13, Merck-Millipore, Берлингтон, Вирджиния, США) которые разводили в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. После нескольких промываний в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) клетки инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами IgG (H + L) козы против мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (разведение 1:1600; Abcam, Уолтем, Массачусетс, США) или козы против кролика конъюгированными с Alexa Fluor 488 (разведение 1:1600; Abcam, Уолтем, Массачусетс, США), разведенными в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина. Затем покровные стекла несколько раз промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) и помещали на предметные стекла со средой ProLong Gold (Life Technologies, Карлсбад, США) с DAPI для окрашивания ДНК. Клетки визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Токио, Япония), оснащенного камерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Йена, Германия). Использовались наборы фильтров UV-2E/C (возбуждение 340–380 нм и эмиссия 435–485 нм), B-2E/C (возбуждение 465–495 нм и эмиссия 515–555 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм и эмиссия 600–660 нм). Для каждой точки данных было визуализировано в общей сложности 300–400 клеток. Фокусы подсчитывали вручную и с использованием программного обеспечения DARFI (<http://github.com/varnivey/darfi>).

Проточная цитометрия

Для количественной оценки доли клеток на стадии раннего апоптоза и погибших клеток использовали ком-

мерческий набор «Vybrant Apoptosis Assay Kit #4» с YO-PRO-1 и йодистый пропидий (PI) для проточной цитометрии (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; каталожный номер: V13243). К каждому 0,5 мл, содержащему 5×10^5 клеток, добавляли 0,5 мкл исходного раствора YO-PRO-1 и 0,5 мкл исходного раствора PI. Клетки инкубировали на льду в течение 20–30 мин. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии (BD FACSCalibur, Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США) с использованием 488 нм лазера с регистрацией зеленой флуоресценции для YO-PRO-1 и красной для PI. В общей сложности для каждого образца получали 10000 событий, которые затем анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo V10 (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Статистический и математический анализ

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборок использовали t-критерий Стьюдента. Сравнение значимости различий угловых коэффициентов линейных уравнений для зависимостей доза–эффект проводили с использованием z-теста. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов \pm стандартная погрешность среднего ($M \pm SEM$).

Результаты и обсуждение

После 4-кратного воздействия цисплатина у выживших клеток наблюдалось изменение фенотипа: гигантские многоядерные клетки, которые оставались dormantными в течение двух недель. Площадь поверхности этих клеток была в несколько раз больше, чем у исходных клеток. Полагают, что формирование dormantных полиплоидных и многоядерных гигантских опухолевых клеток может быть одним из механизмов выживания опухолевых клеток после терапевтических воздействий [16, 17]. После двух недель появлялись активно делящиеся клетки, имеющие размер, сходный с исходными клетками, которые были использованы для дальнейшего анализа. Выжившие и давшие устойчивый рост после воздействия цисплатина клетки получили название A549Pt.

Для сравнительной оценки чувствительности исходных A549 и выживших A549Pt клеток к дополнительному воздействию цисплатина был проведен анализ клеточной гибели с помощью флуоресцентных красителей YO-PRO-1 и PI. Метод основан на свойствах флуоресцентного красителя ДНК YO-PRO-1 избирательно проникать через мембрану клеток на стадии раннего апоптоза, после чего клетки начинают флуоресцировать в зеленой области спектра [18, 19]. Добавление PI позволяет дифференцированно окрасить погибшие клетки (поздний апоптоз + некроз), флуоресцирующие после окраски в красной области спектра. Через мембрану живых клеток эти красители не проникают.

Через 24 ч после тестовой инкубации с цисплатином в концентрации 4 мкг/мл в клетках A549Pt доля клеток на стадии раннего апоптоза была статистически значимо меньше, чем в исходной клеточной линии (рис. 1). Однако анализ доли погибших клеток не выявил статистически значимых различий между клетками A549 и A549Pt при $p=0,14$ (рис. 1), но отмечается тенденция к снижению доли погибших A549Pt клеток. Для окончательного заключения о формировании резистентности A549Pt клеток к цисплатину необходимы более тщательные

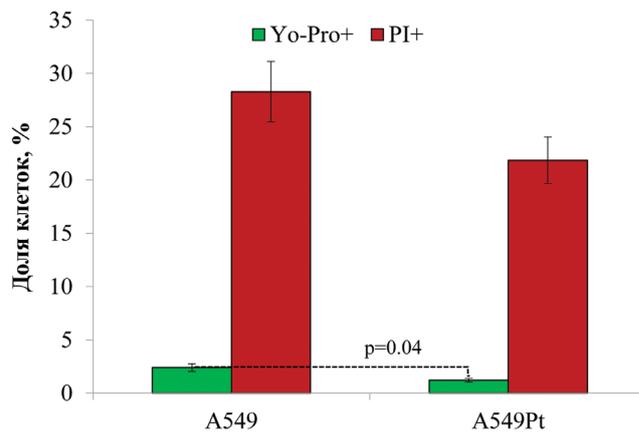


Рис. 1. Доля клеток A549 и A549Pt в стадии раннего апоптоза (YO-PRO-1+) и погибших (PI+) после воздействия цисплатина в концентрации 4 мкг/мл в течение 24 ч

Fig. 1. Proportion of A549 and A549Pt cells in the stage of early apoptosis (YO-PRO-1+) and dead (PI+) after exposure to cisplatin at a concentration of 4 µg/ml for 24 hours

исследования с использованием других концентраций цисплатина, времени инкубации и привлечением других методов оценки клеточной гибели, в том числе репродуктивной гибели с помощью клоногенного теста.

На рис. 2 представлены результаты оценки фокусов γ H2AX и 53BP1 в клетках A549 и A549Pt после 24 ч инкубации с цисплатином в дозе 2 мкг/мл. Показано, что количество фокусов γ H2AX в клетках A549 и A549Pt статистически значимо не различается (рис. 2). Здесь необходимо понимать, что фосфорилирование гистона H2AX осуществляется не только киназами ATM и DNA-PK, активируемыми в ответ на образование «истинных» ДР ДНК, но и киназой ATR, активируемой в ответ на появление фрагментов однострессовой ДНК (ДР ДНК с «липкими» концами и однострессовые участки ДНК, образующиеся в результате эксцизионной репарации нуклеотидов) [20, 21]. Поэтому количество фокусов γ H2AX отражает процесс репарации ДНК не только от ДР, но и от однострессовых разрывов. Анализ количества фокусов более специфичного белка-маркера ДР ДНК 53BP1 выявил статистически значимое снижение их количества в клетках A549Pt по сравнению с исходными клетками A549 (рис. 2). Аналогичные результаты были получены

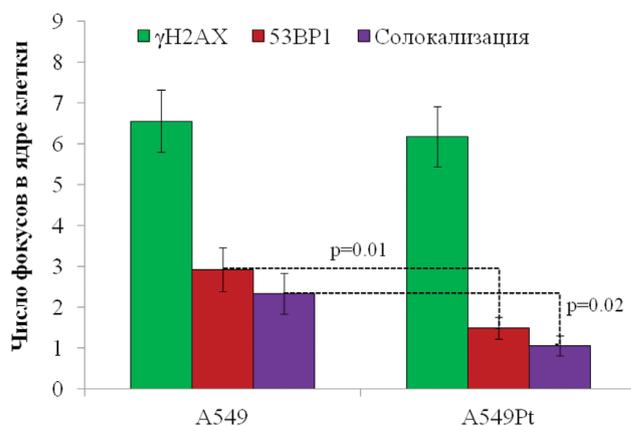


Рис. 2. Количество фокусов γ H2AX, 53BP1 и их солокализация в клетках A549 и A549Pt после инкубации с цисплатином в концентрации 2 мкг/мл в течение 24 ч

Fig. 2. Number of γ H2AX, 53BP1 foci and their colocalization in A549 and A549Pt cells after incubation with cisplatin at a concentration of 2 µg/ml for 24 hours

при анализе солокализации фокусов γ H2AX и 53BP1. Полученные данные косвенно свидетельствуют о том, что в клетках A549Pt отмечается повышенная эффективность репарации ДР ДНК, но не о механизмах эксцизионной репарации нуклеотидов.

На следующем этапе работы была проведена оценка кросс-резистентности клеток A549 и A549Pt к тестируемому воздействию рентгеновского излучения. Для этого использовали анализ остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 24 ч после облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр. Результаты исследования представлены на рис. 3. Было показано, что дозовые зависимости для количества остаточных фокусов γ H2AX могут быть фитированы линейными регрессионными уравнениями: $y=0,97x+2,00$ ($R^2=0,99$) и $y=0,35x+1,64$ ($R^2=0,65$), где y – количество фокусов, а x – доза в Гр, для клеток A549 и A549Pt, соответственно (рис. 3А). Сравнение угловых коэффициентов, показывающих прирост эффекта на единицу, показало, что количественный выход остаточных фокусов γ H2AX в клетках A549Pt был в $\sim 2,9$ ($z=3,4$, $p<0,001$) ниже, чем в исходных клетках A549. В случае дозовых зависимостей для количества остаточных фокусов 53BP1 были получены следующие линейные уравнения: $y=0,67x+0,79$ ($R^2=0,94$) и $y=0,28x+1,18$ ($R^2=0,71$) для клеток A549 и A549Pt соответственно (рис. 3Б). То есть количественный выход остаточных фокусов 53BP1 в клетках A549Pt был в $\sim 2,4$ ($z=2,2$, $p=0,03$) ниже, чем в исходных клетках A549. Для дозовых зависимостей количества солокализованных фокусов γ H2AX и 53BP1 были получены линейные уравнения: $y=0,70x+0,30$ ($R^2=0,95$) и $y=0,29x+0,70$ ($R^2=0,73$) для клеток A549 и A549Pt соответственно. Таким образом, количественный выход солокализованных фокусов был в $\sim 2,4$ ($z=2,4$, $p=0,02$) ниже, чем в исходных клетках A549. В целом, полученные результаты свидетельствуют о повышенной радиорезистентности клеток A549Pt.

Ранее было показано, что из 9 клонов клеток глиомы человека, резистентных к воздействию цисплатина, 8 были также резистентны к воздействию ионизирующего излучения [22]. При воздействии цисплатина на клетки хорошо известно формирование сшивок Pt-ДНК, которые репарируются путем эксцизионной репарации нуклеотидов за счет вырезания сшитых нуклеотидов [23]. Однако, цисплатин активирует и другие пути репарации ДР ДНК, а именно гомологичную рекомбинацию и негомологичное соединение концов [23]. По всей видимости, активация путей репарации ДР ДНК в клетках A549Pt позволяет более эффективно репарировать ДНК, тем самым снижая негативные последствия воздействия ионизирующего излучения.

Заключение

Выжившие и давшие устойчивый рост после воздействия цисплатина клетки НМРЛ A549Pt характеризуются пониженной активацией апоптоза и образованием меньшего количества фокусов 53BP1 в ответ на дополнительное воздействие цисплатина по сравнению с исходными клетками A549. Клетки A549Pt также проявляют резистентность к воздействию рентгеновского излучения, проявляющуюся в снижении количественного выхода фокусов белков-маркеров ДР ДНК γ H2AX и 53BP1. Выявленная в ходе работы резистентность клеток A549Pt к воздействию ионизирующего излучения может существенно снижать эффективность неoadъювантной химиолучевой терапии злокачественных новообразований. Необходимы дальнейшие исследования по выявлению детальных клеточно-молекулярных механизмов приобретённой в ходе химиотерапии устойчивости выживших

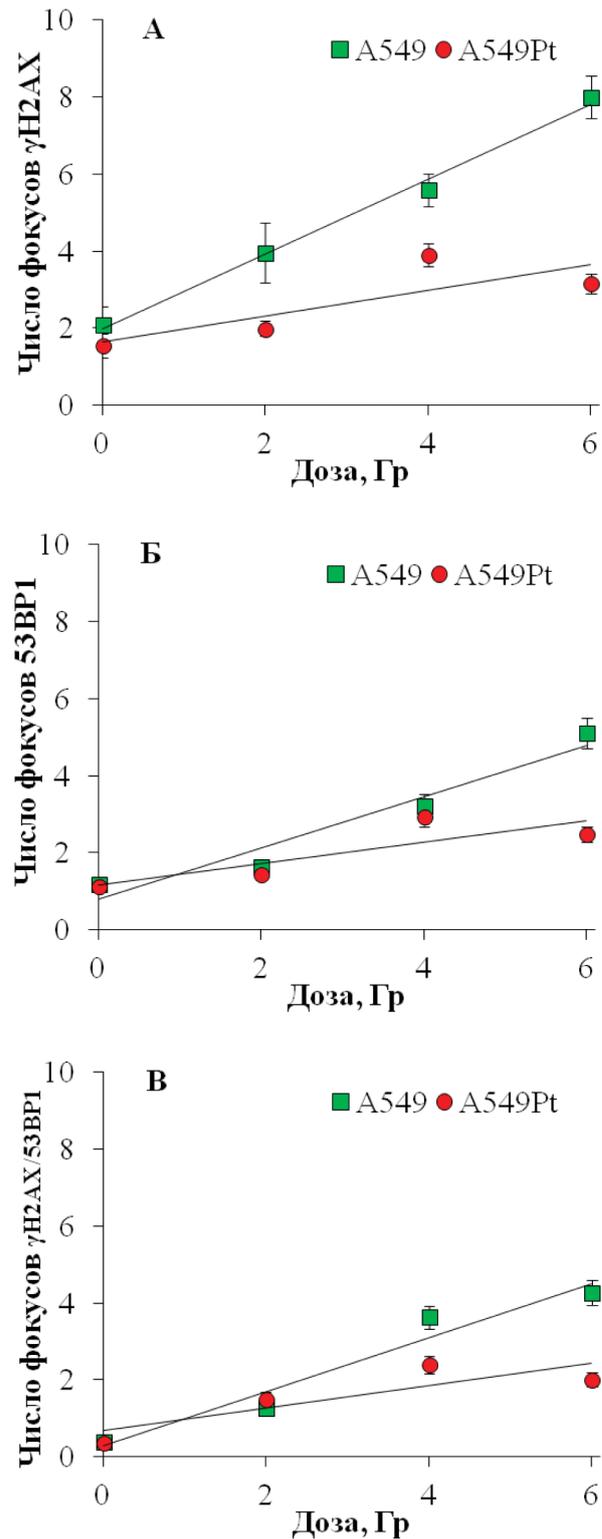


Рис. 3. Дозовые зависимости изменений количества остаточных фокусов γ H2AX (А), 53BP1 (Б) и их солокализация (Б) в клетках A549 и A549Pt через 24 ч после воздействия рентгеновского излучения.

Fig. 3. Dose dependences of changes in the number of residual γ H2AX (A), 53BP1 (B) foci and their colocalization (B) in A549 and A549Pt cells 24 hours after exposure to X-ray radiation

клеток к лучевой терапии. В будущем это позволит увеличить эффективность лечения злокачественных новообразований и избежать возможных рецидивов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Molodtsova D., Guryev D.V., Osipov A.N. Composition of Conditioned Media from Radioresistant and Chemoresistant Cancer Cells Reveals miRNA and Other Secretory Factors Implicated in the Development of Resistance. *International journal of molecular sciences*. 2023;24;22. doi: 10.3390/ijms242216498.
- Alhaddad L., Osipov A.N., Leonov S. The Molecular and Cellular Strategies of Glioblastoma and Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Conferring Radioresistance. *International journal of Molecular Sciences*. 2022;23;21. doi: 10.3390/ijms232113577.
- Leonov S., Inyang O., Achkasov K., Bogdan E., Kontareva E., Chen Y., et al. Proteomic Markers for Mechanobiological Properties of Metastatic Cancer Cells. *International journal of Molecular Sciences*. 2023;24;5. doi: 10.3390/ijms24054773.
- Pustovalova M., Alhaddad L., Blokhina T., Smetanina N., Chigasova A., Chuprov-Netochin R., et al. The CD44high 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;22;5. doi: 10.3390/ijms22052369.
- Twentyman P.R., Wright K.A., Rhodes T. Radiation Response of Human Lung Cancer Cells with Inherent and Acquired Resistance to Cisplatin. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1991;20;2:217-220. doi: 10.1016/0360-3016(91)90093-j.
- Britten R.A., Peacock J., Warenus H.M. Collateral Resistance to Photon and Neutron Irradiation Is Associated with Acquired Cis-Platinum Resistance in Human Ovarian Tumour Cells. *Radiotherapy and Oncology*. 1992;23;3:170-5. doi: 10.1016/0167-8140(92)90327-q.
- Groen H.J.M., Sleijfer S., Meijer C., Kampinga H.H., Konings A.W.T., De Vries E.G.E., et al. Carboplatin- and Cisplatin-Induced Potentiation of Moderate-Dose Radiation Cytotoxicity in Human Lung Cancer Cell Lines. *British Journal of Cancer*. 1995;72:6:1406-11. doi: 10.1038/bjc.1995.522.
- Wilkins D.E., Ng C.E., Raaphorst G.P. Cisplatin and Low Dose Rate Irradiation in Cisplatin Resistant and Sensitive Human Glioma Cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1996;36;1:105-11. doi: 10.1016/s0360-3016(96)00243-x.
- Raaphorst G.P. Concomitant Low Dose-Rate Irradiation and Cis Platin Treatment in Ovarian Carcinoma Cell Lines Sensitive and Resistant to Cis Platin Treatment. *International Journal of Radiation Biology*. 2009;69;5:623-631. doi: 10.1080/095530096145634.
- Leblanc J.M., Raaphorst G.P. Evaluation of Cisplatin Treatment Given Concurrently with Pulsed Irradiation in Cisplatin Sensitive and Resistant Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. *International Journal of Radiation Biology*. 2009;81;6:429-435. doi: 10.1080/09553000500141447.
- Britten R.A., Warenus H.M., White R., Peacock J. BSO-Induced Reduction of Glutathione Levels Increases the Cellular Radiosensitivity of Drug-Resistant Human Tumor Cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1992;22;4:769-72. doi: 10.1016/0360-3016(92)90521-i.
- Osipov A., Chigasova A., Yashkina E., Ignatov M., Fedotov Y., Molodtsova D., et al. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts. *Cells*. 2023;12;8. doi: 10.3390/cells12081209.
- Vorobyeva N.Y., Babayan N.S., Grigoryan B.A., Sargsyan A.A., Khondkaryan L.G., Apresyan L.S., et al. Increased Yield of Residual Gammah2ax Foci in p53-Deficient Human Lung Carcinoma Cells Exposed to Subpicosecond Beams of Accelerated Electrons. *Bull Exp Biol Med*. 2022;172;6:756-759. doi: 10.1007/s10517-022-05472-9.
- Babayan N.S., Guryev D.V., Vorobyeva N.Y., Grigoryan B.A., Tadevosyan G.L., Apresyan L.S., et al. Colony-Forming Ability and Residual Foci of DNA Repair Proteins in Human Lung Fibroblasts Irradiated with Subpicosecond Beams of Accelerated Electrons. *Bull Exp Biol Med*. 2021;172;1:22-5. doi: 10.1007/s10517-021-05323-z.
- Rajkumar P. Cisplatin Concentrations in Long and Short Duration Infusion: Implications for the Optimal Time of Radiation Delivery. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016. doi: 10.7860/jcdr/2016/18181.8126.
- Alhaddad L., Chuprov-Netochin R., Pustovalova M., Osipov A.N., Leonov S. Polyploid/Multinucleated Giant and Slow-Cycling Cancer Cell Enrichment in Response to X-ray Irradiation of Human Glioblastoma Multiforme Cells Differing in Radioresistance and TP53/P53 Status. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24;2. doi: 10.3390/ijms24021228.
- Pustovalova M., Blokhina T., Alhaddad L., Chigasova A., Chuprov-Netochin R., Veviorskiy A., et al. 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;23;9:4922. doi: 10.3390/ijms23094922.
- Pustovalova M., Alhaddad L., Smetanina N., Chigasova A., Blokhina T., Chuprov-Netochin R., et al. 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;21;9. doi: 10.3390/ijms21093342.
- Fujisawa S., Romin Y., Barlas A., Petrovic L.M., Turkecul M., Fan N., et al. Evaluation of YO-PRO-1 as an Early Marker of Apoptosis Following Radiofrequency Ablation of Colon Cancer Liver Metastases. *Cytotechnology*. 2014;66;2:259-273. doi: 10.1007/s10616-013-9565-3.
- Osipov A., Pustovalova M., Grekhova A., Eremin P., Vorobyova N., Pulin A., et al. Low Doses of X-Rays Induce Prolonged and ATM-Independent Persistence of γ H2AX foci in Human Gingival Mesenchymal Stem Cells. *Oncotarget*. 2015;6;29:27275-27287. doi: 10.18632/oncotarget.4739.
- Osipov A., Chigasova A., Yashkina E., Ignatov M., Fedotov Y., Molodtsova D., et al. Residual Foci of DNA Damage Response Proteins in Relation to Cellular Senescence and Autophagy in X-Ray Irradiated Fibroblasts. *Cells*. 2023;12;8:1209. doi: 10.3390/cells12081209.
- Raaphorst G.P., Wilkins D.E., Mao J.P., Miao J.C., Ng C.E. Evaluation of Cross-Resistance between Responses to Cisplatin, Hyperthermia, and Radiation in Human Glioma Cells and Eight Clones Selected for Cisplatin Resistance. *Radiation Oncology Investigations*. 1999;7;3:153-157. doi: 10.1002/(sici)1520-6823(1999)7:3<153::Aid-roi3>3.0.Co;2-t.
- Rocha C.R.R., Silva M.M., Quinet A., Cabral-Neto J.B., Menck C.F.M. DNA Repair Pathways and Cisplatin Resistance: an Intimate Relationship. *Clinics*. 2018;73:e478s. doi: 10.6061/clinics/2018/e478s.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследования выполнены при поддержке Госзадания на НИР шифр «Сигнал» (№ регистрации в системе ЕГИСУ НИОКПР: 123011200048-4).

Участие авторов. Написание статьи: Д.В. Молодцова, А.Н. Осипов; Планирование экспериментов: Д.В. Молодцова, Н.Ю. Воробьева, А.Н. Осипов, Д.В. Гурьев; Выполнение экспериментов: Д.В. Молодцова, Н.Ю. Воробьева, Л.И. Яшкина, Т.М. Блохина; Визуализация: А.Н. Осипов.

Поступила: 20.03.2024. Принята к публикации: 25.04.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The research was carried out with the support of the State Research Assignment cipher «Signal» (registration number in the USISU R&D system: 123011200048-4).

Contribution. Writing: D.V. Molodtsova, A.N. Osipov; Experimental planning: D.V. Molodtsova, N.Yu. Vorobyeva, A.N. Osipov, D.V. Guryev; Experimental work: D.V. Molodtsova, N.Yu. Vorobyeva, L.I. Yashkina, T.M. Blokhina; Visualization: A.N. Osipov.

Article received: 20.03.2024. Accepted for publication: 25.04.2024.