

Ф.А. Малахов¹, М.В. Пустовалова¹, А.В. Александрова¹, Е.Г. Контарева¹,
А.В. Смирнова¹, З. Нофал¹, А.Н. Осипов^{1,2}, С.В. Леонов¹

МИГРАЦИЯ ЧЕРЕЗ УЗКИЕ ПОРЫ ПРИВОДИТ К ПОВЫШЕННОЙ КЛОНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КОНТРОЛЬНЫХ И РАДИОРЕЗИСТЕНТНЫХ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА

¹ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный

² Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Маргарита Витальевна Пустовалова, e-mail: pu.margo@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Лучевая терапия является одним из методов лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), однако ее успешность ограничена в связи с возникновением и развитием опухолевой радиорезистентности. Ранее *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что в зависимости от исследуемых клеточных линий и вида радиационного воздействия, облучение может изменить агрессивность опухоли, уменьшая или повышая инвазивность раковых клеток, оставшихся после облучения. Однако то, как меняются фенотипические признаки самих выживших после облучения опухолевых клеток в результате их миграции, происходящей в ограниченном пористом пространстве опухолевой ткани, изучено не достаточно. Целью настоящего исследования было изучение последствий влияния биофизического воздействия (миграции в ограниченном пространстве) на фенотипические признаки двух изогенных клеточных линий НМРЛ, имеющих различные исходные показатели радиорезистентности и склонности к инвазивности и репопуляции.

Материал и методы: Биофизические исследования на клеточной линии A549 и ее изогенной радиорезистентной сублинии A549IR проводились путем их последовательной трехкратной миграции в ограниченном пространстве мембранных пор с диаметром 8 мкм в камерах Бойдена под влиянием градиента концентрации фетальной бычьей сыворотки. Способность к репопуляции промигрировавших через мембраны популяций клеток была охарактеризована с помощью клонотипического анализа. Экспрессия маркеров – Ki67 (активность в клеточном цикле и реорганизации хроматина), виментина (структурный белок цитоскелета, связанный с миграцией и метастазированием) и степени поглощения флуоресцентных наносенсоров (склонность к метастазированию) – были оценены методом количественного многопараметрического анализа цифровых изображений индивидуальных клеток, полученных с помощью микроскопии высокого разрешения (High Content Imaging and Analysis). Стандартный метод определения клеточной массы с помощью красителя сульфородамина Б после воздействия различных концентраций цисплатина использовался для оценки химиочувствительности опухолевых клеток до и после миграции.

Результаты и заключение: Полученные результаты свидетельствуют о том, что повторяющаяся миграция через ограниченное пространство 8 мкм, имитирующее условия внеклеточного матрикса опухолевого микроокружения, скорее всего вызывает деформацию ядер клеток НМРЛ, снижая Ki67- связанную реорганизацию хроматина и ремодулируя экспрессию генов, включая виментин, что увеличивало химиорезистентность и способность к репопуляции и метастазированию таких клеток вне зависимости от их исходной миграционной способности, а так же химио- и радиочувствительности.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, радиорезистентность, химиорезистентность, миграция в ограниченном пространстве, метастатическая активность, эндцитоз, наносенсоры

Для цитирования: Малахов Ф.А., Пустовалова М.В., Александрова А.В., Контарева Е.Г., Смирнова А.В., Нофал З., Осипов А.Н., Леонов С.В. Миграция через узкие поры приводит к повышенной клонотипической активности и химиорезистентности контрольных и радиорезистентных клеток немелкоклеточного рака легкого человека // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 2. С. 9–15. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-2-9-15

P.A. Malakhov¹, M.V. Pustovalova¹, A.V. Aleksandrova¹, E.G. Kontareva¹,
A.V. Smirnova¹, Z. Nofal¹, A.N. Osipov^{1,2}, S.V. Leonov¹

Repetitive Confined Migration Leads to an Increase in Clonogenic Activity and Chemoresistance of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells, Regardless of Their Initial Chemo- and Radiosensitivity

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

² A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: M.V. Pustovalova, e-mail: pu.margo@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: Radiation therapy can treat non-small cell lung cancer (NSCLC), but its effectiveness is limited by the development of tumor radioresistance. Studies have shown that radiation can affect tumor aggressiveness, either reducing or increasing the invasiveness of remaining cancer cells, depending on the cell lines and radiation type. However, the effect of tumor cell migration in the confined porous space of tumor tissue on their phenotypic characteristics is not well understood. This study aimed to investigate how migration in confined spaces affects the phenotypic traits of two NSCLC isogenic cell lines with varying levels of radioresistance, invasiveness, and repopulation ability.

Material and methods: The biophysical impact on the A549 cell line and its isogenic radioresistant subline A549IR was carried out by their sequential triple migration in a limited space of membrane pores with a diameter of 8 μm in Boyden chambers, following the concentration gradient of fetal bovine serum. The ability to repopulate cell populations migrated across membranes was characterized using clonogenic analysis. We assessed markers such as Ki67 (cell cycle activity), vimentin (a cytoskeletal protein linked to migration and metastasis), and fluorescent nanosensor uptake (indicating metastasis potential) through quantitative analysis of digital images from high-content imaging of individual cells. A standard method for determining cell mass with the dye sulphorodamine B after exposure to different concentrations of cisplatin was used to assess the chemosensitivity of tumor cells before and after migration.

Results and Conclusion: The study shows that repeated migration through an 8 μm pore, which simulates conditions cancer cells experience during metastasis, deforms the nuclei of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. This deformation reduces Ki67-related chromatin reorganization and alters gene expression, notably increasing vimentin. This results in increased chemoresistance and a greater likelihood of repopulation and metastasis in these cells, regardless of their initial ability to migrate or their sensitivity to chemotherapy and radiation.

Keywords: *non-small cell lung cancer, radioresistance, chemoresistance, confined migration, metastatic activity, endocytosis, nanosensors*

For citation: Malakhov PA, Pustovalova MV, Aleksandrova AV, Kontareva EG, Smirnova AV, Nofal Z, Osipov AN, Leonov SV. Repetitive Confined Migration Leads to an Increase in Clonogenic Activity and Chemoresistance of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells, Regardless of Their Initial Chemo- and Radiosensitivity. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(2):9–15. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-2-9-15

Введение

Рак легкого является основной причиной смертности от онкологических заболеваний во всем мире. Наиболее распространенной гистологической формой рака легкого является немелкоклеточный рак (НМРЛ). В клинической практике лечение НМРЛ включает системную терапию с использованием цитотоксических препаратов и/или таргетной терапии, а также лучевую терапию. Однако среди пациентов с НМРЛ примерно 35 % находятся на местнораспространенной неоперабельной стадии, что значительно снижает эффективность системного лечения. Общая выживаемость в течение 5 лет для таких пациентов остается низкой и составляет примерно 10–15 % [1]. Поэтому более глубокое понимание механизмов, лежащих в основе резистентности к радио- и химиотерапии, а также процесса метастазирования, необходимо для разработки эффективных терапевтических стратегий и улучшения результатов лечения пациентов.

Миграция раковых клеток играет важнейшую роль в каскаде инвазии-метастазирования. Жесткость (ригидность) клеточной мембраны – важный биофизический (механо-биологический) параметр, необходимый для изменения формы клеток и проникновения через ограниченные тканевые пространства в процессе локальной инвазии и метастазирования [2]. В ходе этого процесса клетки приобретают повышенную инвазивность и устойчивость к апоптозу, одной из разновидностей программируемой клеточной гибели [3]. Несмотря на то, что значительное количество исследований посвящено первичным механизмам резистентности, взаимосвязь между миграцией в ограниченном физическом пространстве и развитием терапевтической резистентности остается малоизученной. Ранее *in vitro* и *in vivo* исследования показали, что в зависимости от исследуемых клеточных линий и вида радиационного воздействия, облучение может изменить агрессивность опухоли, уменьшая или повышая инвазивность раковых клеток, оставшихся после облучения [4]. Однако, то как меняются фенотипические признаки самих выживших после облучения опухолевых клеток в результате их миграции, происходящей в ограниченном пористом пространстве опухолевой ткани, изучено недостаточно [5]. Целью настоящего исследования было изучение последствий влияния биофизического воздействия (миграции в ограниченном пространстве) на фенотипические признаки двух изогенных клеточных линий НМРЛ, имеющих различные исходные показатели радиорезистентности и склонности к инвазивности

и репопуляции. Следует подчеркнуть, что такого рода воздействие представляет в настоящее время живой интерес среди онкологов в силу его крайней релевантности тем условиям, с которыми сталкиваются опухолевые клетки, находящиеся под воздействием внеклеточного матрикса, образующего оболочку опухоли. Нами были охарактеризованы фенотипические изменения в результате такого воздействия на эти клеточные линии, включая их способность образовывать колонии (склонность к репопуляции), поглощать наносенсоры (метастатический потенциал) и восприимчивость к действию цисплатина (химиорезистентность).

Материал и методы

Культивирование клеток

В работе использовали клеточную линию A549 НМРЛ человека и ее ранее полученную и охарактеризованную радиорезистентную сублинию A549IR [6]. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, Fisher Scientific, Waltham, США), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 0,3 г/л L-глутамина и 1 % пенициллина/стрептомицина (Sigma-Aldrich, США) при 37 °C и 5 % CO₂.

Оценка миграционной способности и получение сублиний высоко мигрирующих в ограниченном пространстве клеток

Клетки, достигшие 90 % конfluence, культивировали в питательной среде без добавления ФБС в течение 24 ч при 37 °C и 5 % CO₂ для ингибирования пролиферации. На следующий день 5×10⁵ клеток в объеме 500 мкл бессывороточной среды RPMI-1640 высевали в верхние вкладыши Камеры Бойдена (шестиугольного формата, Spl life sciences, Республика Корея), имеющие на дне мембрану с порами 8 мкм. 1000 мкл среды RPMI-1640, дополненной 10 % ФБС в качестве хемоаттрактанта, добавляли в нижнюю камеру непосредственно под вставкой. Через 48 ч инкубации клетки, оставшиеся в верхней камере, аккуратно удаляли с помощью ватных тампонов, а мигрировавшие через поры клетки на обратной стороне мембран фиксировали 20 мин в растворе 4 % параформальдегида и окрашивали красителем Crystal violet в течение 30 мин. Изображения промигрировавших клеток получали путем фотографирования нижней стороны вкладыша на микроскопе Leica (Leica Microsystems, Германия). Для получения сублиний высоко-мигрирующих в ограниченном пространстве клеток сначала вставку из планшета аккуратно удаляли пинцетом, а мигрировавшие

клетки как на обратной стороне мембраны, так и клетки, уже опустившиеся на дно нижней камеры, собирали с помощью раствора трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Москва, Россия) и такую процедуру повторяли еще два раза. Таким образом, клетки A549 и A549IR, мигрировавшие через мембрану вставки 3 раза подряд, были названы A549 SM и A549IR SM, соответственно.

Клоногенный анализ

Каждую клеточную линию высевали по 500 клеток/60-миллиметровую чашку Петри и культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Fisher Scientific, Waltham, USA) в стандартных условиях температуры и атмосферы CO₂. Через 15 сут клетки фиксировали метанолом и окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, Россия). Долю выросших колоний (эффективность образования колоний в %) рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ выросших колоний} = \frac{\text{число выросших колоний}}{\text{число посаженных клеток}} \times 100 \% \quad (1)$$

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков виментина и Ki67

Иммунофлуоресцентный анализ проводился согласно методу, описанному нами ранее [6]. Были использованы первичные мышинные антитела к виментину (разведение 1:500, ELK Biotechnology, Китай) и Ki67 (разведение 1:500, EMD Millipore Corporation, США) и вторичные антитела Alexa Fluor® 488 (Goat Anti-Mouse IgG H&L). Интенсивность флуоресценции – экспрессия Ki67 и виментина – оценивалась с помощью количественного многопараметрического анализа цифровых изображений индивидуальных клеток, полученных с помощью микроскопии высокого разрешения (High Content Imaging and Analysis), используя автоматизированную оптическую платформу ImageExpress MicroXL при увеличении $\times 40$. Анализировали не менее 200 клеток.

Анализ поглощения (интернализации) наночастиц

Анализ интернализации наночастиц проводился по ранее описанной нами методике [7], используя карбоксилированные флуоресцентные (возбуждение/эмиссия 488/520 нм) наносферы с диаметром 200 нм (Suzhou Vdo Biotech Co., Ltd. China). Количество частиц, поглощенных клетками НМРЛ, оценивалось по степени их клеточной колоколизации с использованием коэффициента перекрытия Пирсона, рассчитанного на основе данных количественного многопараметрического анализа цифровых изображений не менее 1000 индивидуальных клеток, полученных с помощью микроскопии высокого разрешения (High Content Imaging and Analysis), используя автоматизированную оптическую платформу ImageExpress MicroXL, при увеличении $\times 40$.

Анализ чувствительности клеток к цисплатину

Чувствительности клеток к цисплатину оценивали путем стандартного анализа кривых зависимости массы клеток от 9 различных концентраций цисплатина, взятых в трипликатах. Количество клеточной массы в результате ее окрашивания красителем сульфородамино-В оценивалась по величине оптической плотности (длина волны 510 нм), измеренной на планшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

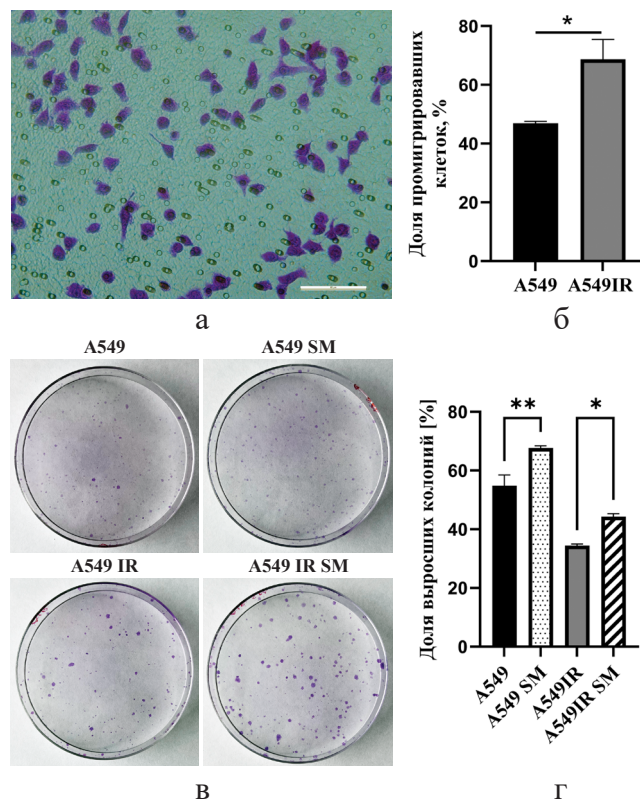


Рис. 1. Оценка инвазивной способности родительских (A549) и радиорезистентных (A549IR) клеток НМРЛ. Репрезентативная фотография клеток, промигрировавших через поры 8 мкм камеры Бойдена (а). Клетки окрашены Crystal violet, шкала 50 мкм. Доля промигрировавших клеток A549 и A549IR (б). Репрезентативная фотография колоний, образованных исходными A549 и A549IR и супермигрирующими A549 SM и A549IR SM клетками (в). Способность к образованию колоний субпопуляциями родительских (A549 и A549IR) и супермигрирующих (A549 SM и A549IR SM) клеток (г)

Fig. 1: Evaluation of the invasive ability of parental (A549) and radioresistant (A549IR) NSCLC cells. Representative photograph of cells that have migrated through 8 µm Boyden chamber pores (a). Cells are stained with Crystal violet, scale bar 50 µm. Proportion of migrated A549 and A549IR cells (b). Representative photograph of colonies formed by parental A549 and A549IR and supermigrating A549 SM and A549IR SM cells (c). Colony formation ability of parental (A549 and A549IR) and subpopulations of supermigrating (A549 SM and A549IR SM) cells (d)

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.0.2.161 (GraphPad Software). Результаты представлены как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD) трех независимых экспериментов. Статистическую значимость проверяли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Уровни значимости обозначены звездочками: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – нет статистически значимых различий (от англ. non-significant).

Результаты и обсуждение

Анализ способности родительских и радиорезистентных клеток НМРЛ к миграции в ограниченном пространстве (3D миграция)

Анализ в камере Бойдена (trans-well анализ) – широко используемый метод измерения способности клеток мигрировать через ограниченное пространство пористого матрикса с диаметром пор 8 мкм в направлении градиента хемоаттрактанта. Результаты показали значительное увеличение миграционной активности клеток

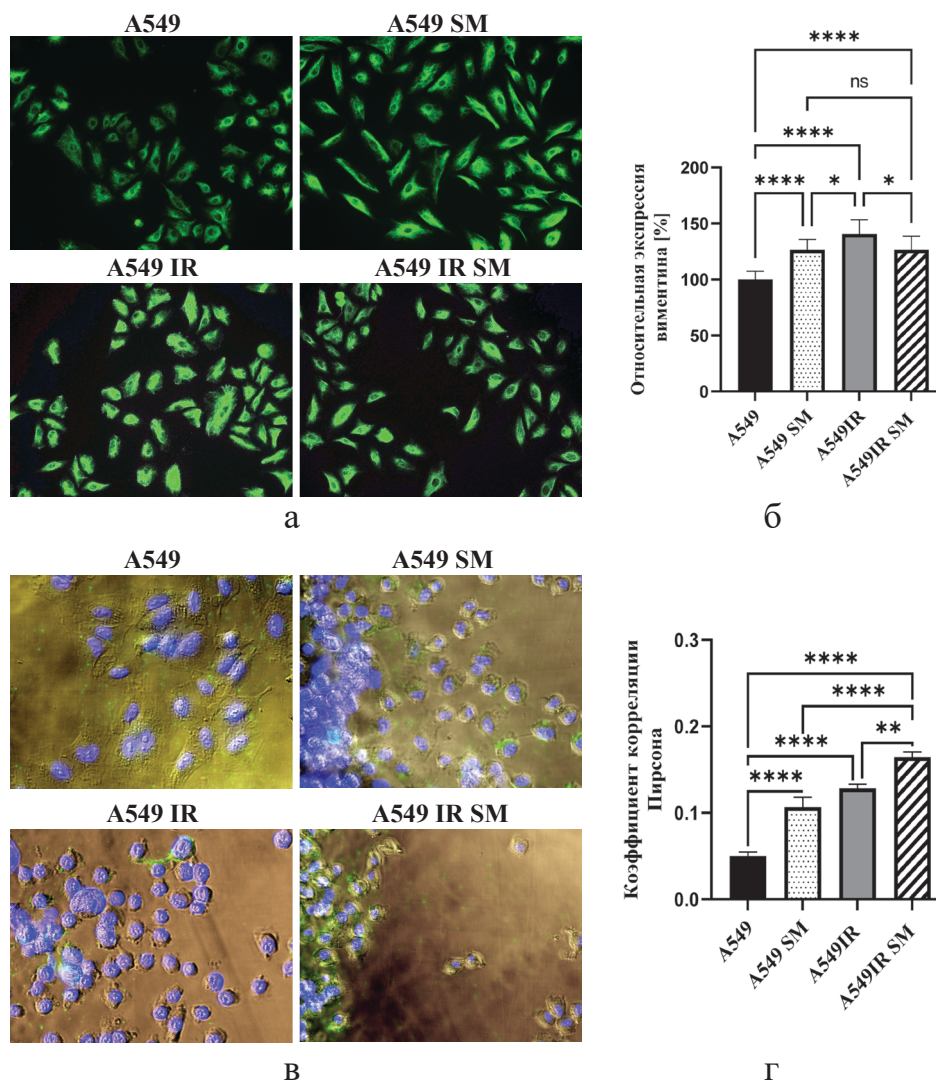


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии виментина оценивалась с помощью иммуноцитохимического анализа. Репрезентативные фотографии клеток с окрашенным виментином (зеленый) (а). Изменение экспрессии виментина в популяциях исходных (A549 и A549IR) и супермигрирующих клеток (A549 SM и A549IR SM) (б). Оценка способности исходных и супермигрирующих клеток к поглощению 200 нм наночастиц. Репрезентативные фотографии клеток с поглощенными наночастицами – клетки в проходящем свете, ядра синие (Hoechst 33342), наночастицы зеленые (Alexa488) (в). Способность к поглощению наночастиц родительскими и супермигрирующими субпопуляциями клеток оценивалась с помощью коэффициента перекрытия Пирсона (г)

Fig. 2: The change in vimentin expression level was evaluated using immunocytochemical analysis. Representative photographs of cells stained with vimentin (green) (a). Change of vimentin expression in the populations of parental (A549 and A549IR) and supermigrating cells (A549 SM and A549IR SM) (б). Evaluation of the ability of parental and supermigrating cells to absorb 200 nm nanoparticles. Representative photographs of cells with absorbed nanoparticles – cells in transmitted light, nuclei blue (Hoechst 33342), nanoparticles green (Alexa488) (в). The nanoparticle uptake capacity of parental and supermigrating subpopulations was assessed using Pearson overlap coefficient (г)

радиорезистентной сублинии A549IR по сравнению с их изогенными родительскими клетками A549 ($p < 0,05$) (рис. 1а, б), что согласуется с полученными ранее литературными данными о увеличении миграционной активности клеток НМРЛ вследствие лучевой терапии [8].

Клоногенный анализ клеток НМРЛ до и после миграции в ограниченном пространстве

Сравнительный клоногенный анализ был использован для оценки склонности клеток к репопуляции. Он основан на подсчете числа колоний, состоящих из не менее чем 50 клеток, образованных единичными прикрепленными клетками в результате «неограниченного» деления (рис. 1в). Результаты показали, что родительские клетки A549 образовывали в 1,6 раз больше колоний, чем их радиорезистентные потомки линии A549IR (рис. 1г), что согласуется с полученными нами ранее данными [9]. В результате трех циклов повторяющейся миграции тех же клеток в ограниченном пространстве обе клеточ-

ные линии A549 SM и A549IR SM значительно ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, соответственно) увеличивали склонность к репопуляции, как видно по увеличению эффективности образования колоний (доля выросших колоний) (рис. 1г). Таким образом, воздействие ограниченной в пространстве миграции, возможно, повышает способность клеток НМРЛ к репопуляции вне зависимости от их исходной чувствительности к облучению и склонности к репопуляции.

Анализ экспрессии виментина в клетках НМРЛ до и после миграции в ограниченном пространстве

Виментин играет решающую роль в подвижности и метастазировании раковых клеток [10]. Кроме того, виментин обладает уникальными свойствами деформационной устойчивости, которые позволяют его филаментам действовать как амортизаторы в клетке, защищая клетку от сжимающих нагрузок, например, во время миграции в ограниченном пространстве [11, 12].

В связи с этим, мы прежде всего сравнили экспрессию этого важного структурного белка цитоскелета в НМРЛ клетках до и после миграционного воздействия. Как и ожидалось, исходное количество виментина в популяциях радиорезистентных клеток A549IR было на 40 % ($p < 0,0001$) выше чем в клетках линии A549 (рис. 26), что вполне согласуется с повышенной миграционной активностью первых (рис. 16). В результате трех циклов повторяющейся миграции тех же клеток в ограниченном пространстве клеточная линия A549 SM увеличила на 25 % экспрессию этого белка ($p < 0,0001$) (рис. 2а, б), тогда как радиорезистентная сублиния A549IR SM уменьшила его представленность на 5 % по сравнению с родительской линией A549IR ($p < 0,05$). Полученные нами результаты позволяют предположить, что повторяющаяся миграция исходно низко- и высокоинвазивных опухолевых клеток в ограниченном пространстве уравнила их миграционный потенциал, одновременно существенно повысив содержание виментина в исходно низкоинвазивных клетках, что может свидетельствовать о повышении их устойчивости к деформациям.

Анализ склонности клеток НМРЛ к метастазированию до и после миграции в ограниченном пространстве

Филаменты виментина напрямую связаны с актиновым цитоскелетом и сетями микротрубочек, которые механически поддерживают уникальные биофизические свойства опухолевых клеток, включая жесткость их мембран [13]. Регуляция актиновых филаментов во время миграции зачастую осуществляется виментин-зависимым образом [14]. Клеточные механизмы (миграция и инвазия), определяющие метастатический потенциал, тесно связаны с механизмами эндоцитоза и биомеханическими характеристиками самих опухолевых клеток. Поэтому сравнительный метастатический потенциал в результате миграции в ограниченном пространстве этих исходно высоко- (A549IR) и низко- (A549) инвазивных клеток был оценён с помощью разработанного нами теста на эффективность поглощения наночастиц (НЧ) [7]. Количество частиц, поглощенных клетками НМРЛ, оценивалось по степени их клеточной колоколизации с использованием коэффициента перекрытия Пирсона, рассчитанного на основе данных количественного многопараметрического анализа цифровых изображений индивидуальных клеток, полученных с помощью микроскопии высокого разрешения (High Content Imaging and Analysis), используя автоматизированную оптическую платформу ImageExpress MicroXL. Как и ожидалось, исходное количество поглощенных флуоресцентных наночастиц радиорезистентными клетками A549IR более чем в 2 раза превышало ($p < 0,0001$) таковое в клетках линии A549 (рис. 2г), что вполне согласуется с повышенным содержанием виментина (рис. 26) и миграционной активностью первых (рис. 16). В результате трех циклов повторяющейся миграции в ограниченном пространстве обе клеточные сублинии продемонстрировали значимое увеличение способности к поглощению НЧ по сравнению с исходными клетками до воздействия миграции ($p < 0,0001$) (рис. 2г). Таким образом, можно предположить, что миграция в физически ограниченном пространстве может вызвать увеличение метастатического потенциала и способности к репопуляции опухолевых клеток независимо от их исходной инвазивности и чувствительности к облучению.

Анализ влияния миграции в ограниченном пространстве на чувствительность клеток НМРЛ к цисплатину

Ранее было показано, что миграция в физически ограниченном пространстве приводит к изменению чувствительности клеток рака молочной железы к цитотоксическому действию доксорубина [15]. Цисплатин является одним из наиболее широко применяемых химиотерапевтических препаратов при лечении пациентов с НМРЛ [16]. Механизм действия данного препарата основан на его способности к алкилированию ДНК, что в свою очередь подавляет биосинтез нуклеиновых кислот, и как следствие вызывает гибель опухолевых клеток. Поскольку мы обнаружили, что миграция в физически ограниченном пространстве может вызвать увеличение метастатического потенциала и способности к репопуляции опухолевых клеток, то вполне логично было проверить чувствительность полученных нами сублиний к действию цисплатина. Количественным показателем чувствительности клеток к любому фармацевтическому препарату является показатель IC50 (или EC50), который определяется как концентрация препарата, вызывающая 50 %-ю гибель (эффект) клеток в популяции [17]. Было обнаружено, что родительские клетки A549 были почти в 2,4 раза более чувствительны ($IC_{50}=10,4$ мкМ), чем радиорезистентные клетки A549IR ($IC_{50}=24,9$ мкМ), как это следует из анализа кривых дозозависимого ответа клеток на действие цисплатина (рис. 3а). После миграции обе клеточные линии продемонстрировали менее значимое снижение чувствительности в 1,06 раза для A549IR SM ($IC_{50}=26,54$ мкМ) и в 1,23 раза для A549 SM ($IC_{50}=12,86$ мкМ), что в определенной степени коррелирует с изменениями в экспрессии виментина (рис. 26), подтверждая таким образом влияние этого белка на химиорезистентность гигантских полиплоидных клеток рака молочной железы [18]. Таким образом, повторяющаяся миграция в ограниченном пространстве приводила к дальнейшему снижению чувствительности клеток к цисплатину практически вне зависимости от их исходной чувствительности к облучению.

Анализ пролиферативного состояния клеток

Помимо различных фаз клеточного цикла, клетки характеризуются более неоднозначным пролиферативным состоянием покоя, которое, как полагают, влияет на их чувствительность к химиотерапии [19, 20]. Пролиферативные состояния обычно оцениваются с помощью иммуногистохимического анализа маркеров пролиферации, в том числе Ki67, при этом склонность к пролиферации признается в течение многих лет в качестве важного прогностического клинического показателя [21]. Последние данные показывают, что точное количественное определение экспрессии Ki67 дает ценную информацию, выходящую за рамки простого определения того, находится ли клетка в пролиферативном состоянии или нет. Этот метод позволяет эффективно различать клетки, быстро проходящие клеточный цикл, которые испытывают короткие периоды покоя, и те дормантные («молчащие») клетки, которые остаются в состоянии покоя в течение значительно более длительного времени, прежде чем в конечном итоге снова иницируют клеточный цикл [22]. Тогда как исходно обе клеточные линии имели примерно одинаковое количество Ki67-положительных клеток, то после миграционного воздействия наблюдалось значимое снижение этого показателя в обеих сублиниях A549 SM ($p < 0,0001$) и A549IR SM ($p < 0,0001$) (рис.

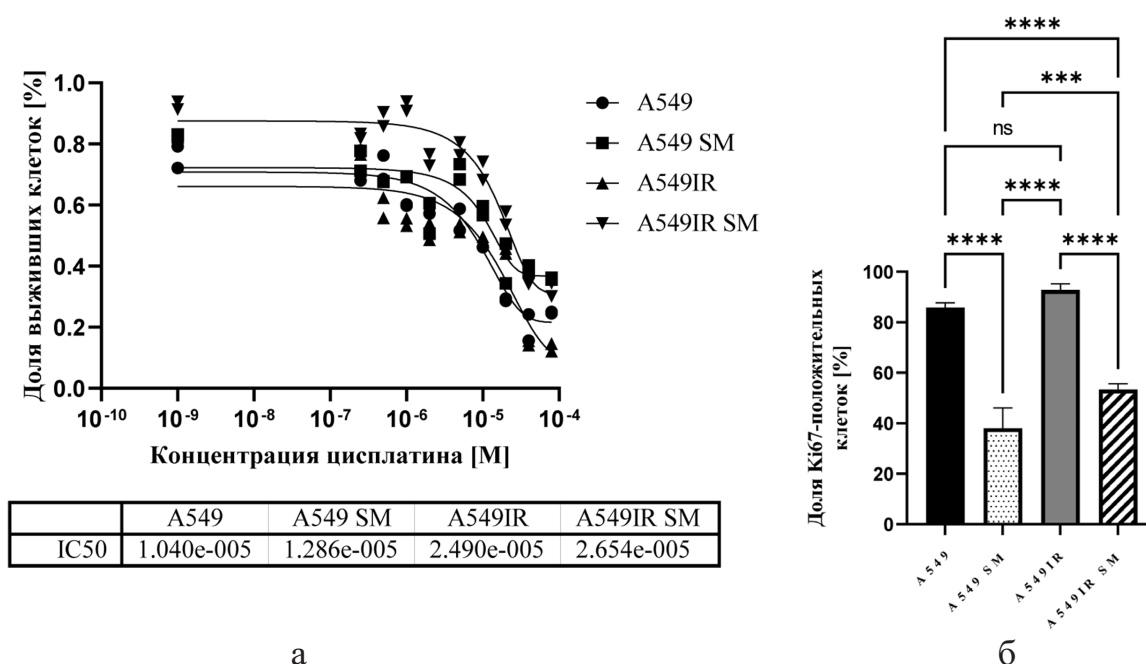


Рис. 3. Анализ чувствительности клеток к цисплатину. Изменение клеточной массы в зависимости от концентрации цисплатина оценивалось с помощью красителя сульфородамина Б. Концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) для всех типов клеток указаны в таблице (а). Изменение пролиферативной активности клеток оценивалось с помощью иммуноцитохимического анализа белка Ki67 (б)

Fig. 3: Analysis of cell sensitivity to cisplatin. Changes in cell mass depending on the concentration of cisplatin were assessed using the sulforhodamine B staining. The concentrations of half-maximal inhibition (IC50) for all cell types are indicated in the Table (a). The change in proliferative activity of cells was assessed by immunocytochemical analysis of Ki67 protein (b)

36), что может свидетельствовать об их пребывании в состоянии остановленного клеточного цикла, потенциально переходящем в состояние дормантности. То, что эти данные противоречат данным о способности этих же клеток к репопуляции (рис. 1г) еще раз подтверждает новую точку зрения, что экспрессия Ki67 – это не просто маркер статуса пролиферации клеток; Он также служит индикатором реорганизации гетерохроматина, что, в свою очередь, способствует ремоделированию экспрессии генов [23, 24]. Если это так, то миграция в ограниченном пространстве, сопровождающаяся деформацией ядер клеток, снижает реорганизацию гетерохроматина в сочетании с ремоделированием экспрессии генов, что может вызвать временную остановку клеточного цикла и переход в состояние дормантности, увеличивая химиорезистентность и способность к репопуляции таких

клеток вне зависимости от их исходной химио- и радиочувствительности.

Заключение

Наши результаты свидетельствуют о том, что повторяющаяся миграция через ограниченное порами 8 мкм пространство, имитирующее условия внеклеточного матрикса опухолевого микроокружения, скорее всего вызывает деформацию ядер клеток НМРЛ, снижая Ki67 – связанную реорганизацию хроматина и ремодулируя экспрессию генов, включая виментин, что увеличивало химиорезистентность и способность к репопуляции и метастазированию таких клеток вне зависимости от их исходной миграционной способности, а так же химио- и радиочувствительности.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Aupérin A., Le Péchoux C., Rolland E., et al. Meta-Analysis of Concomitant Versus Sequential Radiochemotherapy in Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28;13:2181-2190. doi: 10.1200/JCO.2009.26.2543. PMID: 20351327.
2. Friedl P., Wolf K. Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2003;3;5:362-374. doi:10.1038/nrc1075. PMID: 12724734.
3. Fanfone D., Wu Z., Mammi J., et al. Confined Migration Promotes Cancer Metastasis Through Resistance to Anoikis and Increased Invasiveness. *Elife*. 2022;11:e73150. doi:10.7554/eLife.73150. PMID: 35256052.
4. Fujita, M., Yamada, S., & Imai, T. (2015). Irradiation induces diverse changes in invasive potential in cancer cell lines. *Seminars in cancer biology*, 35, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.09.003>
5. Shieh A.C. Biomechanical Forces Shape the Tumor Microenvironment. *Ann Biomed Eng*. 2011;39;5:1379-1389. doi:10.1007/s10439-011-0252-2. PMID: 21253819.
6. Pustovalova M., Alhaddad L., Smetanina N., 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;9:3342. doi:10.3390/ijms21093342. PMID: 32397297.
7. Merkhher Y., Kontareva E., Bogdan E., et al. Encapsulation and Adhesion of Nanoparticles as a Potential Biomarker for TNBC Cells Metastatic Propensity. *Sci Rep*. 2023;13;1:12289. doi:10.1038/s41598-023-33540-1. PMID: 37516753.
8. Wang M., Yi J., Gao H., et al. Radiation-Induced YAP/TEAD4 Binding Confers Non-Small Cell Lung Cancer Radioresistance Via Promoting NR1 Transcription. *Cell Death Dis*. 2024;15;8:619. doi:10.1038/s41419-024-07017-6. PMID: 39187525.
9. Alhaddad L., Pustovalova M., Blokhina T., Chuprov-Netochin R., Osipov A.N., Leonov S. IR-Surviving NSCLC Cells Exhibit Different Patterns of Molecular and Cellular Reactions Relating to the Multifraction Irradiation Regimen and p53-Fam-

- ily Proteins Expression. *Cancers* (Basel). 2021;13;11:2669. doi:10.3390/cancers13112669. PMID: 34071477.
10. Gan, Z., Ding, L., Burckhardt, C. J., Lowery, J., Zaritsky, A., Sitterley, K., Mota, A., Costigliola, N., Starker, C.G., Voytas, D.F., Tytell, J., Goldman, R.D., & Danuser, G. (2016). Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell systems*, 3(3), 252–263.e8.
11. Mendez, M. G., Restle, D., & Janmey, P. A. (2014). Vimentin enhances cell elastic behavior and protects against compressive stress. *Biophysical journal*, 107(2), 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.050/>
12. Hu, J., Li, Y., Hao, Y., Zheng, T., Gupta, S. K., Parada, G. A., Wu, H., Lin, S., Wang, S., Zhao, X., Goldman, R. D., Cai, S., & Guo, M. (2019). High stretchability, strength, and toughness of living cells enabled by hyperelastic vimentin intermediate filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(35), 17175–17180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903890116>.
13. Xuan, B., Ghosh, D., Cheney, E. M., Clifton, E. M., & Dawson, M. R. (2018). Dysregulation in Actin Cytoskeletal Organization Drives Increased Stiffness and Migratory Persistence in Polyploid Giant Cancer Cells. *Scientific reports*, 8(1), 11935. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29817-5>.
14. Esue O., Carson A.A., Tseng Y., Wirtz D. A Direct Interaction between Actin and Vimentin Filaments Mediated by the Tail Domain of Vimentin. *J Biol Chem*. 2006;281;41:30393-30399. doi:10.1074/jbc.M605452200. PMID: 16901892.
15. Shen Q, Hill T, Cai X, Bui L, Barakat R, Hills E, Almugaitieb T, Babu A, Mckernan PH, Zalles M, Battiste JD, Kim YT. Physical confinement during cancer stem cell-like behavior. *Cancer Lett*. 2021 May 28;506:142-151. doi: 10.1016/j.canlet.2021.01.020
16. Bunn P.A. Jr. The Expanding Role of Cisplatin in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Semin Oncol*. 1989;16;4;6:10 21. PMID: 2548280.
17. Cho K., Choi E.S., Kim J.H., Son J.W., Kim E. Numerical Learning of Deep Features from Drug-Exposed Cell Images to Calculate IC50 without Staining. *Sci Rep*. 2022;12;1:6610. Published 2022 Apr 22. doi:10.1038/s41598-022-10643-9. PMID: 35459284.
18. Xuan, B., Ghosh, D., Jiang, J., Shao, R., & Dawson, M.R. (2020). Vimentin filaments drive migratory persistence in polyploid cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(43), 26756–26765. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011912117>
19. Valeriote, F. and L. van Putten, Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review. *Cancer research*, 1975. 35(10): p. 2619-2630;
20. Stover, D.G., et al, The Role of Proliferation in Determining Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Gene Expression-Based Meta-Analysis. *Clinical Cancer Research*, 2016. 22(24): p. 6039-6050.
21. Tubiana, M. et al, The long-term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. *International journal of cancer*, 1984. 33(4): p. 441–445
22. Miller, I. et al, Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell reports*, 2018. 24(5): p. 1105–1112. e5
23. Sobecki, M., et al, The cell proliferation antigen Ki-67 organizes heterochromatin. *elife*, 2016. 5: p. e13722;
24. Mrouj, K., et al, Ki 67 regulates global gene expression and promotes sequential stages of carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021. 118(10): p. e2026507118.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки высшего образования Российской Федерации (Госзадание): «Разработка систем локальной доставки лекарственных препаратов для медицинских целей», номер FSMG-2023-0015, номер соглашения No 075-03-2024-117 от 17.01.2024 г.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.12.2024. Принята к публикации: 25.01.2025.

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

Financing. The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment): “Development of local drug delivery systems for medical purposes”, number FSMG-2023-0015, agreement number No. 075-03-2024-117 dated 17.01.2024.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.12.2024. Accepted for publication: 25.01.2025.