

Д.В. Молодцова^{1,2}, Е.А. Котенкова³, Е.К. Полищук⁴, А.А. Осипов²,
Д.В. Гурьев¹, А.К. Чигасова^{1,2,5}, Н.Ю. Воробьева^{1,2}, А.Н. Осипов^{1,2,3}

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИМИОЛУЧЕВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА, ВЫЖИВШИХ ПОСЛЕ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ОБЛУЧЕНИЯ В СУММАРНОЙ ДОЗЕ 20 Гр

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

³ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный

⁴ Экспериментальная клиника и научно-исследовательская лаборатория биологически активных веществ животного происхождения Федерального исследовательского центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва

⁵ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

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

РЕФЕРАТ

Цель: Получить клетки немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека, выжившие и давшие устойчивый рост после фракционированного воздействия рентгеновского излучения в суммарной дозе 20 Гр, и провести оценку их чувствительности к дополнительному облучению и воздействию цисплатина.

Материал и методы: В работе использовали клеточную линию НМРЛ – А549, которую облучали в режиме фракционирования (5 фракций по 4 Гр) для получения сублинии выживших клеток – А549IR. Клетки А549 и А549IR подвергали тестирующему воздействию рентгеновского излучения или цисплатина. После чего проводили анализ пролиферативной активности, 2D-миграционной способности и эффективности репарации двунитевых разрывов ДНК (ДР) с помощью количественной оценки остаточных фокусов белков γ H2AX и 53BP1.

Результаты: Были получены клетки НМРЛ, которые выжили и дали устойчивый рост после фракционированного облучения рентгеновским излучением в суммарной дозе 20 Гр. Полученные клетки А549IR обладали измененной морфологией, пониженной пролиферативной активностью и повышенной миграционной способностью. Анализ остаточных фокусов 53BP1 после тестирующего облучения этих клеток в дозе 6 Гр свидетельствует о повышенной эффективности репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК. Также было обнаружено, что клетки А549IR более устойчивы к воздействию цисплатина.

Заключение: В целом результаты исследования показывают, что комбинированную химиолучевую терапию для лечения НМРЛ следует назначать с осторожностью, если исследования на модели животных поддержат полученные выводы. Клетки НМРЛ, пережившие воздействие ИИ, могут приобретать резистентность к цисплатину. Для выбора подходящей терапии важно оценить как уже существующую радио- и химорезистентность опухолевых клеток, так и их резистентность к терапевтическим воздействиям, развившуюся во время лечения.

Ключевые слова: клетки НМРЛ, рентгеновское излучение, цисплатин, γ H2AX, 53BP1, остаточные фокусы, двунитевые разрывы ДНК

Для цитирования: Молодцова Д.В., Котенкова Е.А., Полищук Е.К., Осипов А.А., Гурьев Д.В., Чигасова А.К., Воробьева Н.Ю., Осипов А.Н. Чувствительность к химиолучевым воздействиям клеток немелкоклеточного рака легкого человека, выживших после фракционированного облучения в суммарной дозе 20 Гр // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 4. С. 10–15. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-4-10-15

D.V. Molodtsova^{1,2}, E.A. Kotenkova³, E.K. Polishchuk⁴, A.A. Osipov²,
D.V. Guryev¹, A.K. Chigasova^{1,2,5}, N.Yu. Vorobyeva^{1,2}, A.N. Osipov^{1,2,3}

Sensitivity to Chemoradiation Effects of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Surviving Fractionated Irradiation with a Total Dose of 20 Gy

¹ A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

² N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow Region, Dolgoprudny, Russia

⁴ Experimental clinic and research laboratory for bioactive substances of animal origin, V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems, Moscow, Russia;

⁵ N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics, Moscow, Russia

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

ABSTRACT

Objective: To obtain human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells that survived and showed stable growth after fractionated exposure to X-rays at a total dose of 20 Gy and to evaluate their sensitivity to additional irradiation and cisplatin.

Material and methods: The NSCLC cell line A549 was used in the study, and it was irradiated in the fractionated mode (5 fractions of 4 Gy) to obtain a subline of surviving cells – A549IR. A549 and A549IR cells were subjected to testing exposure to X-rays or cisplatin. Then,

proliferative activity, 2D migration capacity and the efficiency of DNA double-strand break (DSB) repair were analyzed using a quantitative assessment of residual foci of the γ H2AX and 53BP1 proteins.

Results: The study yielded NSCLC cells that survived and showed stable growth after fractionated X-ray irradiation with a total dose of 20 Gy. The resulting A549IR cells had altered morphology, decreased proliferative activity, and increased migration capacity. Analysis of residual 53BP1 foci after test irradiation with a dose of 6 Gy indicates increased efficiency of repair of radiation-induced DNA DSBs. It was also found that A549IR cells are more resistant to cisplatin.

Conclusion: Overall, the study results show that combination CRT for the treatment of NSCLC should be prescribed with caution if studies based on the animal model support current conclusions. NSCLC cells that have survived IR exposure may acquire resistance to cisplatin. To select the appropriate therapy, it is important to assess both the existing radio- and chemo-resistance of tumor cells and their resistance to therapeutic effects that developed during treatment.

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

For citation: Molodtsova DV, Kotenkova EA, Polishchuk EK, Osipov AA, Guryev DV, Chigasova AK, Vorobyeva NYu, Osipov AN. Sensitivity to Chemoradiation Effects of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Surviving Fractionated Irradiation with a Total Dose of 20 Gy. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(4):10–15. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-4-10-15

Введение

Химио-, лучевая и химиолучевая терапия (ХЛТ) в настоящее время являются одними из основных методов лечения злокачественных новообразований (ЗНО). Однако наличие радио- и химиорезистентных клеток может приводить к неудаче противоопухолевой терапии, которая обычно показывает достаточно хорошие результаты при лечении большинства типов ЗНО. ХЛТ может проводиться одновременно или последовательно до (неoadьювантно) или после (адьювантно) первичного лечения (хирургия или лучевая терапия) [1]. При последовательной ХЛТ неудача может быть обусловлена перекрестной резистентностью опухолевых клеток. Радиорезистентность и химиорезистентность – два разных фенотипа, и их взаимодействие очень сложное: в одних случаях они обеспечивают защитные эффекты при последующей химиотерапии или облучении, а в других – усиливают повреждающие эффекты. Исследования показывают, что радиорезистентные опухолевые клетки могут демонстрировать устойчивость к воздействию химиопрепаратов [2–5]. Так, показано, что длительная фракционированная лучевая терапия клеток аденокарциномы легких человека привела к снижению регуляции фолатного рецептора альфа, что снизило поглощение препарата во время последующего воздействия пеметрекседа [6]. Механизмы формирования резистентности к противоопухолевой терапии включают эффективную способность к восстановлению, отмену остановки клеточного цикла, уклонение от апоптоза, гетерогенность опухоли, активацию опухолевых стволовых клеток (ОСК), мутации и микроокружение опухоли [7]. Микроокружение опухоли способствует резистентности за счет ремоделирования внеклеточного матрикса, гипоксии, активности ОСК, набора стромальных клеток, таких как опухоль-ассоциированные фибробласты и макрофаги М2, и посредничества паракринной коммуникации [7, 8]. В ответ на противоопухолевую терапию опухолевые клетки выделяют различные паракринные факторы, включая цитокины, интерлейкины, мРНК, некодирующую РНК, такую как миРНК и днкРНК, и другие, которые являются специфичными для состояния терапевтической реакции и опосредуют межклеточную коммуникацию, помогая им адаптироваться [8]. Для оптимизации схем лечения онкологических заболеваний очень важно понимать механизмы формирования радио- и химиорезистентности опухолевых клеток.

Двунитевые разрывы (ДР) являются критическими повреждениями ДНК клеток, а неэффективная репарация приводит к их гибели, мутации или онкотрансформации [9]. Эффективность репарации двунитевых разрывов ДНК (ДР) изучалась путем количественного

анализа выхода остаточных фокусов γ H2AX и 53BP1 через 24 ч после облучения рентгеновским излучением в дозах 2, 4 и 6 Гр или через 24 ч после 24-часового воздействия цисплатина в дозах 2, 4 и 6 мкг/мл. Фосфорилированный гистон H2AX (γ H2AX) и p53-связывающий белок 1 (53BP1) образуются на фланкирующих ДР участках хроматина в процессе репарации и могут быть визуализированы с помощью иммуноцитохимического окрашивания [10]. Количество фокусов этих белков в ядре клетки отражает количество сайтов репарации ДНК, а также кинетику репарации. Максимальное количество фокусов обычно наблюдается в течение 15–60 мин после облучения, а затем их количество уменьшается по экспоненте [11–13]. Фокусы, присутствующие через 24 ч и большее время после облучения, называются остаточными [14]. Полагают, что они являются сайтами репарации сложных, потенциально летальных повреждений ДНК [14, 15]. Фосфорилирование H2AX может осуществляться киназами ATR и ATM, которая активируется в ответ на появление одноцепочечных участков ДНК, образующихся в результате эксцизионной репарации нуклеотидов, поэтому анализ количества фокусов γ H2AX не всегда специфичен для ДР, однако 53BP1 является консервативным белком контрольной точки со свойствами сенсора ДР ДНК [16, 17]. Поэтому оценка солонкализации фокусов γ H2AX и 53BP1 более специфична для изучения эффективности репарации ДР ДНК.

Целью настоящей работы было получение клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека, выживших и давших устойчивый рост после фракционированного воздействия рентгеновского излучения в суммарной дозе 20 Гр, и оценка их чувствительности к дополнительному облучению и воздействию цисплатина. Для этого была проанализирована эффективность репарации ДР ДНК, пролиферативная активность и гибель клеток после воздействия ионизирующего излучения (ИИ) и цисплатина.

Материал и 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-глутамином, 25000 ед/фл пенициллина, 50 мг/фл стрептомицина (Биолот, Россия) и 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone Cytiva, США). Культивирование клеток проводили в стандартных условиях CO₂-инкубатора (37 °C, 5 % CO₂, насыщенная влажность).

Облучение

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

Получение клеток, выживших после воздействия ИИ

Чтобы получить клетки A549, выжившие после ИИ, родительские клетки облучали дозой 4 Гр один раз в день в течение 5 последовательных дней для имитации гипофракционирования. Обычные клинические режимы гипофракционирования включают фракционные дозы 6–10 Гр [18], однако при таком режиме было невозможно получить активно делящиеся клетки A549, поэтому фракционную дозу уменьшили до 4 Гр. После последнего облучения клетки инкубировали до появления активно делящихся клеток, получивших кодовое название A549IR. Для анализа радиочувствительности клетки подвергали дополнительному облучению в дозах 2, 4 и 6 Гр.

Инкубация с цисплатином

Для сравнительной оценки чувствительности к воздействию цисплатина исходные клетки A549 и A549IR подвергали воздействию 2, 4, 6 и 8 мкг/мл цисплатина (Тева, Россия) в течение 24 ч.

Иммуноцитохимия

Клетки фиксировали на покровных стеклах в 4 % параформальдегиде в течение 15 мин при комнатной температуре, затем дважды промывали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и проводили пермеабиллизацию в блокирующем буфере (0,3 % Triton-X100 в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) с добавлением 5 % сыворотки козы для блокирования неспецифического связывания антител в течение 40 мин. Затем клетки инкубировали в течение 1 ч с первичными кроличьими моноклональными антителами против γ H2AX (фосфо S139) (разведение 1:800, клон EP854(2)Y, Abcam, Waltham, MA, USA) или с первичными мышиными моноклональными антителами против 53BP1 (разведение 1:400, клон BP13, Merck-Millipore, Burlington, VA, USA). После нескольких промывок в фосфатно-солевом буфере клетки инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами козы против мыши IgG (H+L) (конъюгированными Alexa Fluor 488, 1:1600; Abcam, Уолтем, Массачусетс, США) или козы против кролика IgG H&L (Alexa Fluor® 555, разбавление 1:1600; Abcam, Уолтем, Массачусетс, США). Затем покровные стекла трижды промывали в фосфатно-солевом буфере и монтировали на предметные стекла с нанесением капли ProLong Gold (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) с DAPI для контрастного окрашивания ДНК. Клетки просматривали и получали изображения с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Токио, Япония), оснащенного камерой высокого разрешения ProgRes MFcool (Jenoptik AG, Йена, Германия). Использовались следующие 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 540–555 нм и эмиссия 600–660 нм). Для каждой точки данных было получено изображение в общей сложности 100 клеток. Фокусы подсчитывались вручную и с использованием программного обеспечения DARFI (<http://github.com/varnivey/darfi>; доступ 19 сентября 2016 г.).

Проточная цитометрия

Количественную оценку доли клеток на стадии раннего апоптоза и мертвых клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора красителей Vybrant Apoptosis Assay Kit #4 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США; каталожный номер: V13243) с YO-PRO-1, селективно окрашивающим апоптотические клетки, и йодистым пропидием (PI), окрашивающим мертвые клетки. 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. Окрашенные клетки инкубировали в темноте в течение 20–30 мин, после чего измеряли на проточном цитометре Guava EasyCyte (EMD Millipore Corporation, Биллерика, Массачусетс, США) количество апоптотических и мертвых клеток с возбуждением 488 нм с зеленой флуоресцентной эмиссией для YO-PRO-1 (т. е. полоса пропускания 525/30) и красной флуоресцентной эмиссии для PI (полоса пропускания 695/50). Для каждого образца было получено 5000 событий; полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo V10 (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Анализ миграционной активности с помощью скретч-теста

Клетки культивировали в 96-луночном планшете до достижения монослоя, после чего наносили «царапину» (англ. scratch) в середине монослоя с помощью стерильного наконечника микропипетки на 200 мкл. С помощью микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Япония) с увеличением $\times 4$, получали изображения начальных «царапин» в нулевой момент времени ($t = 0$ ч) и через 24 ч ($t = \Delta$ ч). Миграционную активность клеток оценивали с использованием программы ImageJ. Миграционная активность клеток была представлена как площадь зарастания поверхности «царапины» % от исходной площади «царапины».

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий выборок использовали t-критерий Стьюдента ($p < 0.05$). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов $\pm$ стандартная погрешность среднего ($M \pm SEM$).

Результаты

После завершения воздействия на родительские клетки A549, выжившие клетки вошли в фазу полиплоидных гигантских опухолевых клеток и оставались в состоянии покоя в течение 2 недель. Полиплоидные гигантские опухолевые клетки демонстрируют смешанный стареющий и покоящийся фенотип, и с наступлением благоприятных условий покоящиеся клетки дают начало активно пролиферирующим клеткам. Площадь поверхности полиплоидных гигантских опухолевых клеток была в 8 раз больше, чем у контрольных клеток. Через 2 недели появились активно делящиеся клетки (A549IR) и их использовали для дальнейших экспериментов.

Наличие характеристик резистентности в полученных клетках A549IR оценивали с помощью анализа клеточной гибели методом проточной цитометрии. После тестового воздействия ИИ в дозе 6 Гр доля мертвых клеток A549IR была ниже, чем у родительских клеток A549, однако эта разница была статистически незначима

(рис. 1). Морфология клеток A549IR свидетельствовала о признаках эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Это изменение направляет переход клеток из эпителиального в мезенхимальный тип, что может быть связано с прогрессированием опухоли и приобретением инвазивных характеристик злокачественных новообразований. Визуально клетки показывают увеличенные размеры, приобретают более веретенообразную клеточную границу с большим количеством цитоплазмы, с контактом между клетками через фокальные точки, а не скопления клеток.

Для определения повышенной инвазивности в линиях A549IR на основе наблюдения за признаками ЭМП морфологии клеток 2-D миграция клеток была оценена с помощью скретч-теста. Данные показали повышенную миграционную способность клеток A549IR по сравнению с исходными клетками A549, что свидетельствует о приобретении характеристик инвазивности (рис. 2).

Пролиферативная активность клеток A549IR была ниже (48 ч), чем в исходной клеточной линии (24 ч). Дополнительное воздействие ИИ в дозах 2, 4 и 6 Гр приводило к более выраженному ее замедлению по сравнению с исходными клетками A549 (рис. 3).

На рис. 4 представлены результаты иммуноцитохимического анализа остаточных фокусов γ H2AX, 53BP1 и их солокализации через 24 ч после облучения клеток A549 и A549IR в дозах 2, 4 и 6 Гр. Статистически значимое снижение количества остаточных фокусов в клетках

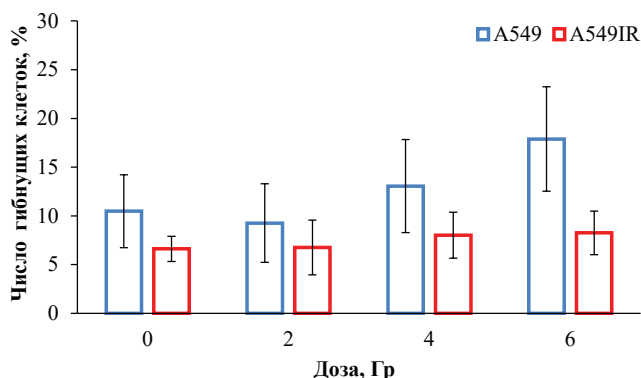


Рис. 1. Доля мертвых клеток (PI+), оцененная методом проточной цитометрии через 24 ч после облучения в дозах 2–6 Гр ($n=3$)

Fig. 1. The percent of dead cells (PI+) as assessed by flow cytometry 24 hours after exposure to different doses of IR ($n=3$)

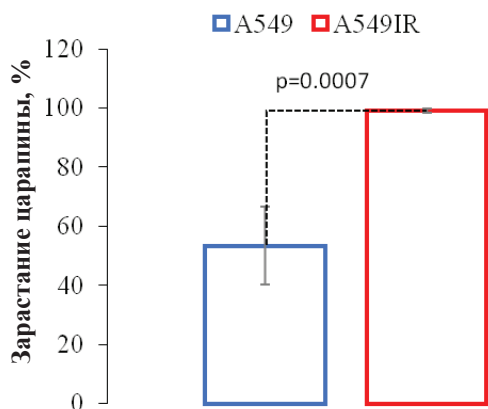


Рис. 2. 2D миграция клеток A549IR и A549 за 24 ч ($n=3$)

Fig. 2. 2D migration of A549IR and Control cells after 24 hours ($n=3$)

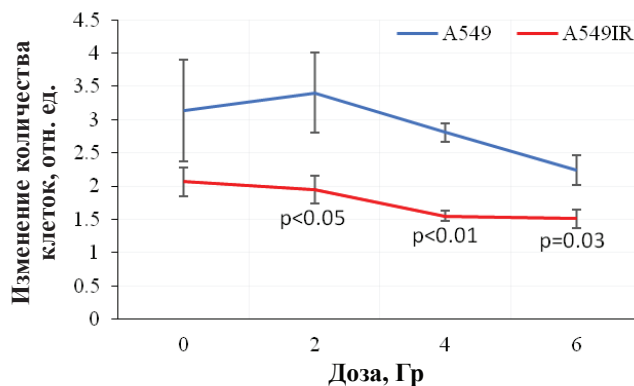


Рис. 3. Изменения количества клеток A549 и A549IR через 48 ч после облучения ($n=3$)

Fig. 3. Changes in the number of cells of the parent A549 and A549IR 48 hours after exposure to different doses of IR ($n=3$)

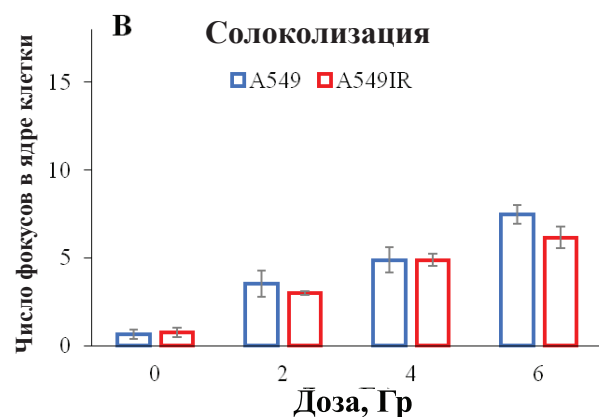
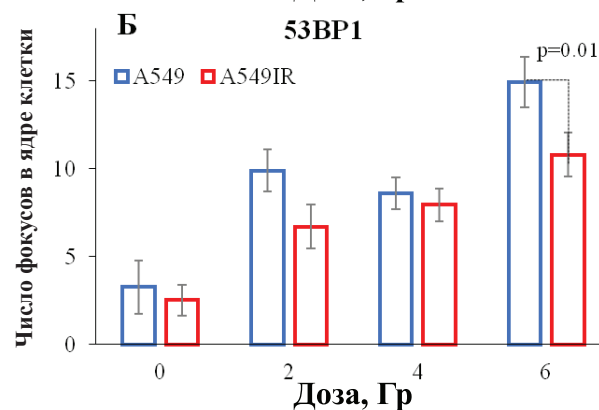
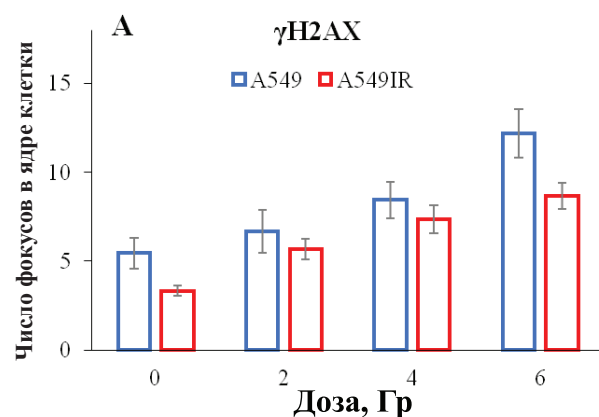


Рис. 4. Количество остаточных фокусов γ H2AX (А), 53BP1 (Б) и их солокализация (В) в клетках A549IR и A549 через 24 ч облучения ($n=3$)

Fig. 4. Number of residual γ H2AX (A), 53BP1 (B) and colocalized (B) foci in previously irradiated A549IR and parental A549 cells 24 hours after X-ray irradiation with doses of 2, 4 and 6 Gy ($n=3$)

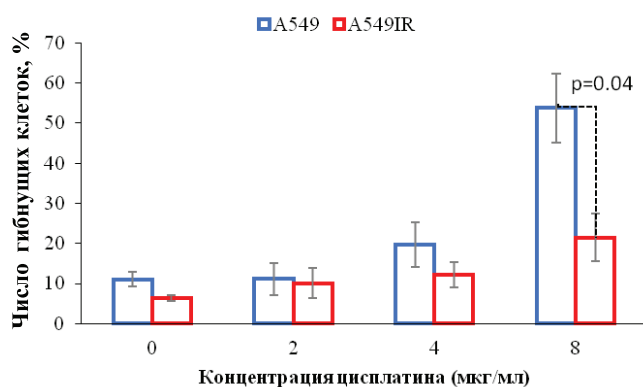


Рис. 5. Доля мертвых клеток (PI+), оцененная методом проточной цитометрии через 24 ч после воздействия цисплатина различных концентраций ($n=3$)

Fig. 5. The percent of dead cells (PI+) as assessed by flow cytometry 24 hours after exposure of A549IR cells to different concentrations of cisplatin (B) ($n=3$)

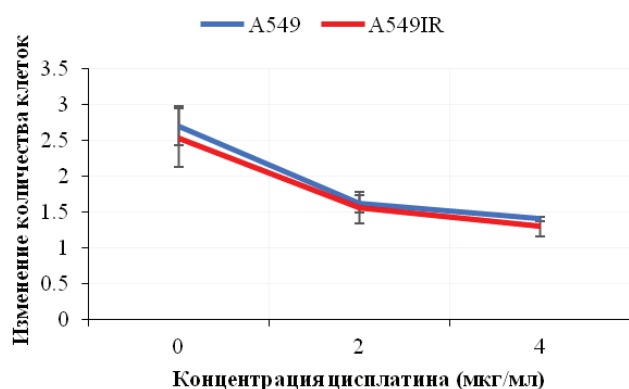


Рис. 6. Изменение количества клеток A549 и A549IR через 48 ч после воздействия цисплатина различных концентраций ($n=3$)

Fig. 6. Changes in the number of cells of the parent A549 and A549IR 48 hours after exposure to different doses of cisplatin ($n=3$)

A549IR по сравнению с клетками A549 было показано только для фокусов 53BP1 после облучения дозе 6 Гр.

Также была проведена оценка перекрестной резистентности клеток A549 и A549IR к цисплатину. Результаты анализа клеточной гибели с помощью проточной цитометрии показывают, что после воздействия на клетки A549IR 8 мкг/мл цисплатина процент клеток PI+ был значительно ниже, чем в исходной клеточной линии A549 (рис. 5). Это свидетельствует об их повышенной резистентности к воздействию цисплатина, возможно за счет механизма уклонения от гибели.

Не было отмечено различий в пролиферативной активности клеток A549IR и A549 после воздействия цисплатина в концентрации 2 и 4 мкг/мл (рис. 6).

Результаты анализа количества остаточных фокусов γ H2AX, 53BP1 и их солокализации через 24 ч после воздействия цисплатина в дозах 2, 4 и 6 мкг/мл на клетки A549IR и A549 представлены на рис. 7. При концентрации цисплатина 2 мкг/мл наблюдалось значительно меньшее количество остаточных фокусов 53BP1 в клетках A549IR по сравнению с клетками A549. Для всех других точек сравнения статистически значимых различий не было обнаружено.

Обсуждение

В ходе работы были получены клетки НМРЛ, которые выжили и дали устойчивый рост после фракциони-

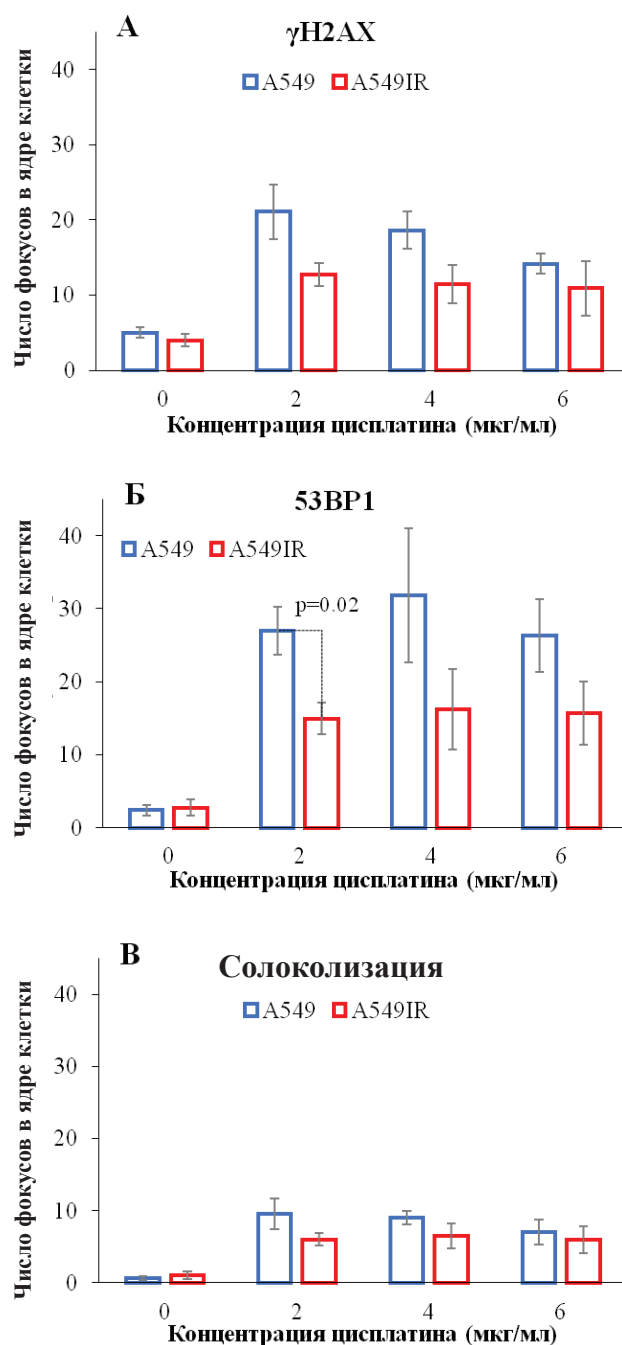


Рис. 7. Количество остаточных фокусов γ H2AX (А), 53BP1 (Б) и их солокализация (В) в контрольных и ранее облученных (A549IR) клетках через 24 ч после воздействия цисплатина различных концентраций ($n=3$)

Fig. 7. Amount of residual γ H2AX (A), 53BP1 (B) and colocalized (B) foci in control and previously irradiated (A549IR) cells 24 hours after a 24-hour incubation in cisplatin at a concentration of 2, 4 and 6 μ g/ml ($n=3$)

рованного облучения рентгеновским излучением в суммарной дозе 20 Гр (клетки A549IR). Полученные клетки обладали измененной морфологией, пониженной пролиферативной активностью и повышенной миграционной способностью. Анализ остаточных фокусов 53BP1 после тестирующего облучения этих клеток в дозе 6 Гр свидетельствует о повышенной эффективности репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК. Также было обнаружено, что клетки A549IR более устойчивы к воздействию цисплатина.

Заключение

В целом результаты исследования показывают, что комбинированную ХЛТ для лечения НМРЛ следует назначать с осторожностью. Клетки НМРЛ, пережившие воздействие ИИ, могут приобретать резистентность к цисплатину. Для выбора подходящей терапии важно оценить как уже существующую радио- и химиорезистентность опухолевых клеток, так и их резистентность

к терапевтическим воздействиям, развившуюся во время лечения. Разработка диагностической панели для определения резистентности опухоли поможет в выборе эффективной онкологической терапии, поскольку уже существуют перспективные маркеры радио- и химиорезистентности, например специфические микроРНК, обнаруживаемые как внутриклеточно, так и в плазме крови [8].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Watanabe S-i., Nakagawa K., Suzuki K., Takamochi K., Ito H., Okami J., et al. Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Stage III Non-Small Cell Lung Cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2017;47;12:1112-8. doi: 10.1093/jjco/hyx147.
2. Hao W., Wu L., Cao L., Yu J., Ning L., Wang J., et al. Radioresistant Nasopharyngeal Carcinoma Cells Exhibited Decreased Cisplatin Sensitivity by Inducing SLC1A6 Expression. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:629264. doi: 10.3389/fphar.2021.629264.
3. Gomez-Casal R., Epperly M.W., Wang H., Proia D.A., Greenberger J.S., Levina V. Radioresistant Human Lung Adenocarcinoma Cells that Survived Multiple Fractions of Ionizing Radiation are Sensitive to HSP90 Inhibition. *Oncotarget*. 2015;6;42:44306-22. doi: 10.18632/oncotarget.6248.
4. Wang Y., Huang J., Wu Q., Zhang J., Ma Z., Ma S., et al. Down-regulation of Breast Cancer Resistance Protein by Long-Term Fractionated Radiotherapy Sensitizes Lung Adenocarcinoma to SN-38. *Investigational New Drugs*. 2021;39;2:458-68. doi: 10.1007/s10637-020-01003-3.
5. Payton C., Pang L.Y., Gray M., Argyle D.J. Exosomes Derived from Radioresistant Breast Cancer Cells Promote Therapeutic Resistance in Naïve Recipient Cells. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11;12. doi: 10.3390/jpm11121310.
6. Wang Y., Huang J., Wu Q., Zhang J., Ma Z., Zhu L., et al. Decitabine Sensitizes the Radioresistant Lung Adenocarcinoma to Pemetrexed Through Upregulation of Folate Receptor Alpha. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:668798. doi: 10.3389/fonc.2021.668798.
7. 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;21:13577 doi: 10.3390/ijms232113577.
8. Molodtsova D., Guryev D.V., Osipov A.N. Composition of Conditioned Media from Radioresistant and Chemo-resistant Cancer Cells Reveals miRNA and other Secretory Factors Implicated in the Development of Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24;22:16498. doi: 10.3390/ijms242216498.
9. Babayan N., Grigoryan B., Khondkaryan L., Tadevosyan G., Sarkisyan N., Grigoryan R., et al. Laser-Driven Ultrashort Pulsed Electron Beam Radiation at Doses of 0.5 and 1.0 Gy Induces Apoptosis in Human Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20;20:51-40. doi: 10.3390/ijms20205140.
10. Shibata A., Jeggo P.A. Roles for 53BP1 in the Repair of Radiation-Induced DNA Double Strand Breaks. *DNA Repair*. 2020;93:102915. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102915.
11. Osipov A.N., Pustovalova M., Grekhova A., Eremin P., Vorobyeva 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;29:27275-87. doi: 10.18632/oncotarget.4739.
12. Osipov A., Chigasova A., Yashkina E., Ignatov M., Vorobyeva N., Zyuzikov N., et al. Early and Late Effects of Low-Dose X-ray Exposure in Human Fibroblasts: DNA Repair Foci, Proliferation, Autophagy, and Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25;15:8253 doi: 10.3390/ijms25158253.
13. Chigasova A.K., Pustovalova M.V., Osipov A.A., Korneva S.A., Eremin P.S., Yashkina E.I., et al. Post-Radiation Changes in The Number of Phosphorylated H2ax and Atm Protein Foci in Low Dose X-Ray Irradiated Human Mesenchymal Stem Cells. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2024;69;1:15-9. doi: 10.33266/1024-6177-2024-69-1-15-19.
14. Osipov A., Chigasova A., Belov O., Yashkina E., Ignatov M., Fedotov Y., et al. Dose Threshold for Residual γ H2AX, 53BP1, pATM and p-p53 (Ser-15) Foci in X-Ray Irradiated Human Fibroblasts. *International Journal of Radiation Biology*. 2025;101;3:1-10. doi: 10.1080/09553002.2024.2445581.
15. 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.
16. Djuzenova C.S., Zimmermann M., Katzer A., Fiedler V., Distel L.V., Gasser M., et al. A Prospective Study on Histone γ -H2AX and 53BP1 Foci Expression in Rectal Carcinoma Patients: Correlation with Radiation Therapy-Induced Outcome. *BMC Cancer*. 2015;15;1:856. doi: 10.1186/s12885-015-1890-9.
17. Katsube T., Mori M., Tsuji H., Shiomi T., Wang B., Liu Q., et al. Most Hydrogen Peroxide-Induced Histone H2AX Phosphorylation is Mediated by ATR and is not Dependent on DNA Double-Strand Breaks. *Journal of Biochemistry*. 2014;156;2:85-95. doi: 10.1093/jb/mvu021.
18. Arcangeli S., Greco C. Hypofractionated Radiotherapy for Organ-Confined Prostate Cancer: is Less More? *Nature Reviews Urology*. 2016;13;7:400-8. doi: 10.1038/nrurol.2016.106.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследования выполнены при поддержке Госзадания на НИР шифр «Сигнал» (№ регистрации в системе ЕГИСУ НИОКТР: 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, Е.А. Котенкова, Е.К. Полищук, А.А. Осипов, А.К. Чигасова; Визуализация: А.Н. Осипов.

Поступила: 20.03.2025. Принята к публикации: 25.04.2025.

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 EGISU 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, E.A. Kotenkova, E.K. Polishchuk, A.A. Osipov, A.K. Chigasova; Visualization: A.N. Osipov.

Article received: 20.03.2025. Accepted for publication: 25.04.2025.