

ВЛИЯНИЕ ПРОТОННОГО И γ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ПУЛ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В МОДЕЛИ МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ B16 *IN VIVO*

А.О. Якимова¹, О.Н. Матчук^{1,2}, Е.И. Селиванова¹, В.Р. Гусарова¹, В.А. Мосина¹, С.Н. Корякин^{1,3}, И.А. Замулаева^{1,2}

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

² Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

³ Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия
e-mail: anna.prosovszkaya@gmail.com

Резюме. На модели мышинной меланомы B16 *in vivo* продемонстрированы отличия в действии протонного и фотонного (γ -) излучения на первичный очаг опухоли на молекулярном и клеточном уровнях. Показано, что одной из причин, определяющих менее выраженный клинический ответ опухоли на фотонную терапию по сравнению с протонной, может являться активация процесса эпителиально-мезенхимальной транзиции и увеличение пула опухолевых стволовых клеток после действия γ -излучения и отсутствие этих эффектов при использовании протонов.

Ключевые слова: экспрессия генов, меланома B16, радиотерапия, протоны, γ -излучение, опухолевые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальная транзиция

EFFECTS OF PROTON AND γ -IRRADIATION ON CANCER STEM CELL POPULATION AND GENE EXPRESSION IN B16 MOUSE MELANOMA MODEL *IN VIVO*

A.O. Yakimova¹, O.N. Matchuk^{1,2}, E.I. Selivanova¹, V.R. Gusarova¹, V.A. Mosina¹, S.N. Koryakin^{1,3}, I.A. Zamulaeva^{1,2}.

¹A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

² Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

³Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – Branch of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia
e-mail: anna.prosovszkaya@gmail.com

Summary. Differences in the effects of proton and photon (γ -) radiation on the primary tumor focus were demonstrated at the molecular and cellular levels using the B16 mouse melanoma model *in vivo*. It has been shown that one of the reasons that determine the less pronounced clinical response of tumor to photon therapy compared to proton therapy may be activation of epithelial-mesenchymal transition and increase in cancer stem cell pool after γ -irradiation and the absence of these effects when using protons.

Key words: gene expression, B16 melanoma, radiotherapy, protons, γ -radiation, cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition

Протонное и γ -излучение широко используется в современной клинической практике для лечения злокачественных новообразований различных локализаций. С точки зрения долговременных результатов лечения, протонное излучение имеет явные преимущества в дополнение к известному снижению лучевых осложнений со стороны нормальных тканей [1]. Так, в целом ряде исследований показано многократное

повышение выживаемости без прогрессирования и общей выживаемости больных после протонной терапии по сравнению с этими показателями после стандартной радиотерапии с использованием фотонного излучения [2]. При этом большинство авторов признают, что относительная биологическая эффективность (ОБЭ) ускоренных протонов в клиническом диапазоне доз и энергий составляет всего 1,1, и именно эта величина учитывается при планировании протонной терапии. Следует заметить, что оценка ОБЭ выполнялась, как правило, в экспериментах *in vitro* и не учитывала изменения, происходящие на уровне организма [3]. В целом, имеющиеся клинические и экспериментальные данные указывают на актуальность поиска механизмов, отличающих биологическое действие протонов и фотонов (в том числе γ -квантов) в условиях *in vivo*. Поскольку существенное влияние на рост опухоли, метастазирование и исход лечения оказывают опухолевые стволовые клетки (ОСК), а важную роль в формировании пула ОСК играет эпителиально-мезенхимальная транзикация (ЭМТ), именно эти процессы стали предметом изучения в настоящей работе.

Целью работы является изучение эффектов действия протонного и γ -излучения на пул ОСК и экспрессию генов, регулирующих ЭМТ и стволовые свойства клеток, на модели меланомы линии В16 *in vivo*.

Материалы и методы. Клетки меланомы В16 культивировали в стандартных условиях *in vitro*, затем вводили внутримышечно по 200 тыс. клеток в заднюю лапу самок мышей линии С57В1/6j.

Облучение первичного очага меланомы в дозе 10 Гр осуществляли однократно на 10 сутки после трансплантации, когда опухоль становилась видна макроскопически. Локальное γ -облучение проводили на установке «Луч-1» от источника ^{60}Co . Облучение протонами проводили на комплексе протонной терапии «Прометеус» в модифицированном пике Брэгга.

Через 2 и 9 суток после облучения осуществляли эвтаназию животных и забор аутопсийного материала из периферических участков опухоли. Оценка доли ОСК проводили при помощи проточной цитометрии по методу SP (Side Population). Образцы опухолей предварительно подвергали ферментативной дезагрегации и окрашиванию по методике, подробно описанной в работе [4].

Изменения в экспрессии генов (*Vim*, *N-cad*, *Trim28*) оценивали при помощи ПЦР в реальном времени методом $\Delta\Delta\text{Ct}$, в качестве референса выбраны гены *Hprt* и *Ipo8*, показавшие наилучшую стабильность экспрессии в условиях этих экспериментов согласно данным сервиса RefFinder [5]. Дизайн геноспецифичных праймеров проводили при помощи онлайн-сервиса Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>).

Статистическую обработку данных проводили при помощи программ «Origin 6.0» (Microcal Software, Inc.) и «Statistica 6.0» (StatSoft., Inc.).

Исследование одобрено Комиссией по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (разрешение № 1-СИ-00014 от 08.09.2020).

Результаты и обсуждение. В работе определена доля ОСК (клеток SP) через 2 и 9 суток после облучения протонами и γ -квантами в дозе 10Гр. Установлено, что на обоих сроках наблюдения после облучения протонами этот показатель соответствовал уровню необлученного контроля, что указывает на отсутствие резистентности популяции ОСК к протонному излучению по сравнению с остальными клетками. В то же время известно, что ОСК обладают более высокой устойчивостью к фотонному (рентгеновскому, γ -) излучению по сравнению с остальными опухолевыми клетками, что приводит к повышению доли ОСК после облучения, как показывают исследования многочисленных авторов, включая собственные [6]. В частности, по нашим данным

через 2 суток после γ -облучения наблюдается 7-кратное увеличение доли ОСК по сравнению с контрольным уровнем ($p < 0,01$), которое со временем снижается до контрольных значений. Столь разительное отличие в действии протонов и γ -квантов на пул ОСК, вероятно, объясняется наличием плотной ионизирующего компонента в модифицированном пике Брэгга, что приводит к формированию более сложных повреждений ДНК, которые трудно репарируются даже в ОСК, исходно имеющих более эффективные системы репарации. Также можно предположить, что репрограммирование опухолевых клеток при облучении γ -квантами и протонами различается (в первом случае активируется переход не стволовых клеток в пул стволовых, во втором – этот процесс не активируется или снижается).

Полученные на клеточном уровне результаты хорошо согласуются с данными на молекулярном уровне. Установлено, что средний уровень экспрессии маркеров ЭМТ – генов *Vim* и *N-cad*, кодирующих белки виментин и N-кадгерин, соответственно, через 2 суток после γ -облучения несколько выше, чем после облучения протонами ($p = 0,054$ для *Vim*, $p = 0,002$ для *N-cad*). Следует отметить, что через 9 суток после протонного и γ -облучения уровень экспрессии этих генов не отличался в сравниваемых группах. В совокупности, эти данные свидетельствуют о смещении равновесия в сторону активации ЭМТ в близкие сроки после действия γ -излучения. Напротив, облучение протонами не приводит к такому эффекту. Примечательно, что в обоих случаях изменение экспрессии генов *Vim* и *N-cad* хорошо согласуется с изменением доли ОСК, что прекрасно соответствует современным представлениям о роли ЭМТ в генерации пула этих клеток. Еще одним аргументом в пользу существенных различий в реакции пула ОСК на воздействие изучаемых типов ионизирующего излучения является более выраженное снижение экспрессии гена *Trim28* под действием протонов, чем после γ -облучения ($p = 0,0031$) через 2 суток после воздействия; через 9 суток отличия сохраняются на уровне статистической тенденции ($p > 0,05$). Примечательно, что *Trim28* вовлечен в регуляцию ЭМТ и стволовых свойств клеток, а высокий уровень экспрессии этого гена коррелирует с плохим прогнозом для пациента.

Таким образом, эффекты действия протонного и γ -излучения на пул ОСК отличаются на молекулярном и клеточном уровнях. В совокупности, полученные данные позволяют заключить, что одной из причин менее выраженного клинического ответа опухоли на фотонную терапию по сравнению с протонной может являться активация процессов ЭМТ и увеличение пула ОСК после γ -облучения и отсутствие этих эффектов при использовании протонных пучков.

Список литературы:

6. Ng W.T., But B., Wong C.H.L., Choi C.W., Chua M.L.K., Blanchard P., Lee A.W.M. Clin Transl Radiat Oncol, 2022, V. 37, P. 41-56.
7. Yang J.T., Wijetunga N.A., Pentsova E., Wolden S., Young R.J., Correa D., Zhang Z., Zheng J., Steckler A., Bucwinska W., Bernstein A., Betof Warner A., Yu H., Kris M.G., Seidman A.D., Wilcox J.A., Malani R., Lin A., DeAngelis L.M., Lee N.Y., Powell S.N., Boire A. J Clin Oncol, 2022, V. 40, P. 3858-3867.
8. Wang L., Fossati P., Paganetti H., Ma L., Gillison M., Myers J.N., Hug E., Frank S.J. Int J Part Ther, 2021, V. 8, P. 3-13.
9. Zamulaeva I. A., Matchuk O. N., Selivanova E. I., Yakimova A. O., Mosina V. A., Koryakina S. N., Kaprin A. D., Boreyko A. V., Bugay A. N., Chausov V. N. and E. A. Krasavin. Physics of Particles and Nuclei Letters, 2023, V. 20, P. 63–75.
10. Xie, F., Wang, J., Zhang, B. Functional & Integrative Genomics, 2023, V. 23: 125 .
11. Матчук О. Н., Орлова Н. В., Замулаева И. А. Радиационная биология. Радиоэкология, 2016, №5, С. 487-493.