

УДК 576.08:57.044

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ КЛЕТОЧНОМ СТАРЕНИИ, ИНДУЦИРОВАННОМ ОБЛУЧЕНИЕМ

© 2025 г. А. П. Родимцев*, Г. И. Блинова, Е. Н. Толкунова

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: a. p.rod@mail.ru

Поступила в редакцию 05.05.2025

После доработки 24.06.2025

Принята к публикации 25.06.2025

Обоснование и цель. Высокий уровень активных форм кислорода (АФК) в клетке может быть как следствием, так и причиной клеточного старения. Ответ опухолевых и нормальных клеток на облучение, вызывающее клеточное старение, схож в общем, но различается в деталях. Изучение этих различий может дать ключ к повышению эффективности и безопасности лучевой терапии. **Материал и методика.** Старение клеток аденокарциномы A549 и мезенхимных стволовых клеток индуцировали облучением. Оценивали изменения морфологии клеток, накопление в них липофусцина и экспрессию генов. **Результаты и обсуждение.** Более всего экспрессия генов *DUOX1*, *GPX1*, *PRDX2* и *SIRT2* повышается в опухолевых клетках A549, а экспрессия *FAS*, *PRDX1*, *PRDX5*, *SOD1* и *NOS2* — в нормальных клетках. **Заключение.** Опухолевые и нормальные клетки реагируют на развитие сенесцентности по-разному: продуцируют разный секреторный фенотип SASP и по-разному меняют экспрессию генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе.

Ключевые слова: клеточное старение, активные формы кислорода, индуцированное облучение

Принятые сокращения: АФА — активные формы азота; АФК — активные формы кислорода; МСК — мезенхимные стволовые клетки; СОД — супероксиддисмутаза; PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; qPCR — количественная цепная полимеразная реакция в реальном времени; SASP — сенесценс-ассоциированный секреторный фенотип.

DOI: 10.7868/S3034606125030047

Клеточное старение (сенесцентность) — это состояние стабильного ареста пролиферации, сопряженное с высоким уровнем метаболизма и экспрессии. Оно вызывается широким спектром стрессоров: истощением теломер в ходе деления, активацией онкогенов и повреждением ДНК разнообразными агентами. Клеточное старение, вызванное истощением теломер, называется репликативным, а вызванное остальными причинами — преждевременным, или индуцированным.

Состояние клеточного старения, вызванное разными причинами, в разных клетках может отличаться в деталях, но в общем его картина схожа. Сенесценс-ассоциированный арест пролиферации опирается на работу сигнальных путей p53/p21 и p16/pRB (Kumari, Jat, 2021). В XX веке такой арест считали необратимым, но за последние два десятилетия накопились свидетельства возвращения сенесцентных клеток к пролиферации — сперва индуцированного (Beausejour, 2003; Lapasset

et al., 2011), а потом и спонтанного (Reimann et al., 2024). Сенесцентные клетки выделяют широкий и разнообразный набор цитокинов, хемокинов, транскрипционных факторов и матриксных металлопротеаз, объединенный понятием сенесценс-ассоциированного секреторного фенотипа (SASP) (Gorgoulis et al., 2019).

Сенесцентные клетки играют разнообразные роли в жизни организма, как негативные, так и позитивные. Они появляются и устраняются в тканях, проходящих процессы развития и регенерации, выделяемый SASP при этом служит для привлечения иммунных клеток и ремоделирования ткани (Gems, Kern, 2022). Репликативное и онкоген-индуцированное старение служат эффективными барьерами на пути опухолевой трансформации. Однако SASP, выделяемый сенесцентными клетками, способствует нарастанию хронического низкоуровневого воспаления, вносящего вклад в старение организма. При этом наблюдается эффект паракринного старения,

при котором клетки, не подвергавшиеся воздействию обычных факторов клеточного старения, становятся сенесцентными только из-за того, что воспринимают SASP от соседних сенесцентных клеток. Таким образом, количество сенесцентных клеток в организме нарастает, вместе с ним растет и уровень воспаления.

Рост числа сенесцентных клеток способствует развитию многих возраст-зависимых заболеваний (López-Otín et al., 2023), а селективное устранение сенесцентных клеток во взрослом организме замедляет их развитие (Baker et al., 2011). Радио- и химиотерапия вводят опухолевые клетки в состояние клеточного старения, таким образом останавливая рост новообразования. Спонтанное возвращение таких клеток к пролиферации чрезвычайно маловероятно для каждой отдельной клетки, но вполне возможно для хотя бы одной клетки из множества. При этом возвращение к пролиферации клетки, единожды развившей полноценный сенесцентный фенотип, придает ей стволовые свойства, что делает ее особенно опасной в плане рецидива опухоли (Milanovic et al., 2018).

В качестве побочного продукта многих нормальных и патологических процессов в клетке образуются свободные радикалы — молекулы, атомы которых содержат во внешней оболочке по меньшей мере один неспаренный электрон, который делает их высокорективными. Наиболее часто встречающиеся свободные радикалы и активные молекулы в биологических системах образуются при восстановлении кислорода (активные формы кислорода, АФК) и азота (активные формы азота, АФА) (Jomova et al., 2023). АФК играют важную роль в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза и некроза. Низкие и средние уровни АФК и АФА необходимы для поддержания многих важных физиологических функций, окислительно-восстановительного гомеостаза и регуляции ключевых факторов транскрипции. Напротив, избыточное образование АФК приводит к нарушению окислительно-восстановительного гомеостаза, что, в свою очередь, вызывает окислительный стресс и опосредованное повреждение ДНК, белков и липидов (Liguori et al., 2018).

Окислительный стресс, характеризующийся смещением равновесия между образованием и элиминацией свободных радикалов в сторону их образования, часто возникает во время заживления ран и при опухолевых заболеваниях, а также в ответ на ультрафиолетовое излучение, лучевую терапию и химиотерапию (Azzam et al., 2012; Angsutararux et al., 2015; Jager de et al., 2017) и является фактором

патогенеза ряда хронических заболеваний и старения (Harman, 1956; Valko et al., 2007).

АФК играют важную роль в клеточном старении. В его процессе нарушается функция митохондрий, и дерегуляция электронно-транспортной цепи порождает увеличение количества АФК (Davalli et al., 2016). В клетке накапливаются агрегаты окисленных белков и липидов с включениями катионов металлов — липофусцин. Он усиливает генерацию АФК в клетке, действуя как часть цикла с положительной обратной связью. Во-первых, в него включаются катионы переходных металлов, в том числе железа, которое способно менять свою степень окисления, катализируя на поверхности липофусцинового агрегата реакцию Фентона, приводящую к образованию свободных радикалов кислорода (Höhn et al., 2010). Во-вторых, липофусцин осложняет аутофагию и протеасомную деградацию, блокируя способность клетки избавляться от окисленных макромолекул (Davalli et al., 2016). Чем больше липофусцина, тем активнее генерация АФК и слабее механизмы протеостаза, тем больше образование нового липофусцина.

Но АФК не только следуют за развитием сенесцентного фенотипа — они могут быть и первопричиной клеточного старения. Свободные радикалы повреждают ДНК, активированные киназы ATM и ATR включают ответ на повреждение, и если повреждения остаются unrepaired, а стресс оказывается недостаточно острым для вызова апоптоза, то клетка становится сенесцентной (Kumar, Jat, 2021). В исследовательской практике широко используется метод индукции клеточного старения при помощи перекиси водорода. Использование для индукции сенесцентности ионизирующего излучения также предполагает повреждение макромолекул свободными радикалами, образующимися при радиолизе молекул воды (Ibragimova et al., 2024).

Для контроля уровня АФК клетки обладают различными антиоксидантными системами, такими как супероксиддисмутаза (СОД), которые преобразуют супероксидный анион-радикал в H_2O_2 , и другие ферменты, восстанавливающие H_2O_2 до воды (каталаза, пероксиредоксины и глутатионпероксидазы).

Скорость метаболизма, пролиферативная активность и уровень АФК в опухолевых клетках значительно выше, чем в нормальных (Jomova et al., 2023), поэтому воздействия, затрагивающие генерацию АФК, могут по-разному влиять на опухолевые и нормальные клетки. Понимание роли АФК в индукции и поддержании сенесцентного фенотипа позволит разработать

терапевтические вмешательства, направленные на модулирование уровней АФК в опухолевых клетках (Holmström, Finkel, 2014; Cheung, Vousden, 2022), сделать методы неинвазивного лечения онкологических заболеваний более разрушительными по отношению к опухолевым клеткам и (или) более щадящими по отношению к нормальным клеткам организма, увеличив таким образом эффективность терапии и снизив ее побочные эффекты.

На основании изложенного цель представленной работы состояла в том, чтобы сравнить формирование сенесцентного фенотипа и изменение экспрессии генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе, у опухолевых и нормальных клеток в условиях, моделирующих лучевую терапию опухоли. Для достижения этой цели решали следующие задачи: индуцировать клеточное старение в опухолевых и нормальных клетках ионизирующим излучением; подтвердить формирование клетками в облученных популяциях сенесцентного фенотипа, сравнив накопление в них липофусцина, морфологические изменения и изменение уровней экспрессии генов маркерных белков клеточного старения; сравнить изменение уровней экспрессии генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе. Дополнительно мы сравнивали вызванные облучением изменения в трех линиях мезенхимных стволовых клеток человека для выбора из их числа наиболее адекватной модели клеточного старения, индуцированного радиацией, для дальнейших исследований.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии. В работе использовали линии клеток человека из Коллекции культур клеток позвоночных (Центр коллективного пользования Института цитологии РАН, Санкт-Петербург): клетки аденокарциномы легкого человека (линия A549), мезенхимные стволовые клетки (МСК) из крайней плоти трехлетнего ребенка (FRSN), МСК из крайней плоти ребенка 2.5 лет (FRSN-1), МСК из пульпы молочного зуба 6-летнего ребенка (MSC-DP). Все клетки культивировали на среде DMEM («БиолоТ», Россия), содержащей 10 % бычьей фетальной сыворотки (HiMedia, Бразилия).

Индукция клеточного старения рентгеновским облучением. Использовали рентгеновскую установку РАП 150300-14, тип рентгеновской трубки 1.2-ЗБМП5-300 (ОАО «Актюбрентген», Россия)

и дозу 10 Гр при мощности поглощенной дозы 1 Гр/мин, напряжении 200 кВ и токе 13 мА.

Выявление липофусцина. Использовали описанный метод (Evangelou, Gorgoulis, 2017). Предварительно посеянные на покровные стекла клетки фиксировали в 5 %-ном растворе параформальдегида (Sigma, США) в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, «БиолоТ», Россия) в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее после трехкратной промывки PBS проводили окрашивание. Для этого покровное стекло с фиксированными клетками инкубировали 2 мин в 70 %-ном этаноле, затем 6 мин в капле свежеприготовленного раствора судана черного В, перевернув покровное стекло с клетками на каплю, нанесенную на предметное стекло через фильтр с насадкой 25 мкм. Далее со стекла удаляли избыток красителя салфеткой, быстро окунали в 50 %-ный этанол 3 раза и затем промывали в дистиллированной воде. Для дальнейшего микроскопирования препарат заключали в 40 %-ный раствор глицерина в TBS. Съемку осуществляли на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия) с камерой DFC420 (Leica Camera AG, Германия).

Анализ экспрессии маркеров индуцированной сенесценции на уровне мРНК.

Для выделения РНК использовали набор реактивов RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Клетки лизировали добавлением 200 мкл буфера RLT (Qiagen, США) непосредственно в лунку культурального планшета. Гомогенизированный образец центрифугировали 5 мин при $\geq 8000 g$ для удаления клеточного дебриса, отбирали лизат и добавляли к нему 600 мкл 70 %-ного этанола, перемешивали. Наносили по 600 мкл полученного раствора на колонку и центрифугировали 30 с при $\geq 8000 g$, жидкость после центрифугирования удаляли из пробирки, повторяли этот этап дважды. Далее промывали колонку 700 мкл промывающего буфера RW1 (Qiagen, США), центрифугировали 30 с при $\geq 8000 g$. Затем дважды промывали в 500 мкл буфера RPE (Qiagen, США) при тех же условиях центрифугирования. Проводили дополнительный этап сушки колонки центрифугированием в течение 2 мин при $\geq 8000 g$. Затем переносили колонку в новую пробирку и элюировали РНК, используя 50 мкл воды, очищенной от РНКаз. Измеряли концентрацию РНК на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) при длине волны 260 нм. РНК хранили при $-70^\circ C$.

Синтез кДНК проводили с использованием набора реактивов для обратной транскрипции ОТ-М — MuLV-RN («Биолабмикс», Россия).

Протокол рассчитан на проведение реакции обратной транскрипции в объёме 20 мкл. Все манипуляции выполняли на льду. Добавляли в пробирку 0.5 мкг РНК и воду, обработанную диэтилпирикарбонатом («Биолабмикс», Россия), до объёма 11 мкл. Затем добавляли по 1 мкл 20 мкМ раствора случайного гексопраймера («Биолабмикс», Россия), прогревали смесь 3 мин при 70 °С и снова возвращали на лёд для отжига праймера на матрице. Добавляли предварительно приготовленную смесь следующего состава: 4 мкл 5-кратного реакционного буфера; 2 мкл 0.1 М ДТТ; 1 мкл смеси dNTP (10 мМ); 1 мкл M — MuLV-RN-ревертазы (100 ед./мкл) (все от «Биолабмикс», Россия). Инкубировали 10 мин при 25 °С и затем 60 мин при 42 °С. Синтезированную кДНК хранили при –20 °С. Для проведения ПЦР в реальном времени матрицу разводили в 5 раз и использовали 1 мкл на реакцию.

Полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (qPCR) проводили, используя реактивы «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue» («Биолабмикс», Россия) по протоколу производителя. Анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора SYBR. Реакцию

проводили трижды, результаты документировали, используя прибор Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, США) и соответствующее программное обеспечение, которое позволяло автоматически нормализовать количество ПЦР-продуктов. В качестве референсного гена использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*.

В подборе праймеров для генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе, руководствовались рекомендациями (Chukavin et al., 2023). Использованные праймеры («СИНТОЛ», Россия) перечислены в табл. 1.

Статистическая обработка данных. Данные qPCR анализировали с помощью программного обеспечения для термоциклера Bio-Rad CFX96. Данные представлены в виде средних значений и их среднеквадратических отклонений (число технических повторов $n = 3$ или указано отдельно), уровень значимости P определяли с помощью парного t -теста Стьюдента для независимых выборок с поправкой для множественных сравнений методом Шидака–Холма в программе GraphPad Prism 10.4.0; ns — $P > 0.05$, (*) — $P < 0.05$; (**) — $P < 0.01$; (***) — $P < 0.001$ по сравнению с контролем.

Таблица 1. Использованные праймеры

Белок	Ген	Прямой (F) и обратный (R) праймер
GAPDH	<i>GAPDH</i>	F: TGACCTCAACTACATGGTTTAC
		R: CTCCACGACGTA CT CAGC
p16	<i>CDKN2A</i>	F: GCACCAGAGGCAGTAACCAT
		R: AAAC TACGAAAGCGGGGTGG
p21	<i>CDKN1A</i>	F: TCTTGTACCCTTGTGCCTCG
		R: AGATGTAGAGCGGGCCTTTG
CCL2	<i>CCL2</i>	F: TCATAGCAGCCACCTTCATTC
		R: CCTCTGCACTGAGATCTTCCT
Ил-1β	<i>IL1B</i>	F: AGCTCGCCAGTGAAATGATG
		R: GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
Ил-8	<i>CXCL8</i>	F: GCCAACACAGAAATTATTGTAAAGCTT
		R: CCTCTGCACCCAGTTTTCTT
PAI-1	<i>SERPINE1</i>	F: ACCGCAACGTGGTTTTCTCA
		R: TTGAATCCCATAGCTGCTTGAAT
RPS6KB1	<i>RPS6KB1</i>	F: TGGCATAGAGCAGATGGATGTG
		R: AGAGTTCCGGCTGTCGTATTGGA
TNF-α	<i>TNF</i>	F: CCTGACATCTGGAATCTG
		R: TCTCAAGGAAGTCTGGAA
ApoE	<i>APOE</i>	F: CTGCGTTGCTGGTCACTTC
		R: CTCTGTCTCCACCGCTTGCT
DUOX1	<i>DUOX1</i>	F: TGAGCGGCACTTCCAGAAG
		R: GACGGCCAAAGTGGGTGAT
FAS	<i>FAS</i>	F: GAATCATCAAGGAATGCACACTCA
		R: AAAGCCACCCCAAGTTAGATCTG
GPX1	<i>GPX1</i>	F: CCTCCCCTTACAGTGCTTGTTCT
		R: GCACACATGGCGCAATTG

Таблица 1. Окончание

Белок	Ген	Прямой (F) и обратный (R) праймер
NOS2	<i>NOS2</i>	F: CCGCATGACCTTGGTGTTT
		R: TCCAGCATCTCCTCCTGGTAGA
PRDX1	<i>PRDX1</i>	F: CTGGGACCCATGAACATTCC
		R: AAGACCCCATAAATCCTGAGCAA
PRDX2	<i>PRDX2</i>	F: TCCTTCGCCAGATCACTGTAA
		R: CAGCCGCAGAGCCTCATC
PRDX5	<i>PRDX5</i>	F: AGATGATTCGCTGGTGTCCAT
		R: ACTATGCCATCCTGTACCACCAT
SIRT2	<i>SIRT2</i>	F: GCTGGAACAGGAGGACTTGGT
		R: TGGCGCTGACGCAGTGT
SOD1	<i>SOD1</i>	F: TGGTGTGGCCGATGTGTCT
		R: GTGCGGCCAATGATGCA

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение морфологии и накопление липофусцина в опухолевых и нормальных клетках после облучения в дозе 10 Гр. Клетки, подвергнутые облучению в дозе 10 Гр, в течение последующей недели претерпевали морфологические изменения, характерные для клеток, становящихся сенецентными, но выраженность этих изменений

различалась для клеток разных линий. К восьмым суткам после облучения в клеточных популяциях, как и ожидали, заметно возрастало число клеток с увеличенным объемом цитоплазмы, увеличенным ядром и ядерными аномалиями (многоядерностью или ядром сложной неправильной формы) (рис. 1).

Накопление липофусцина после облучения было ярко заметно при окраске суданом черным

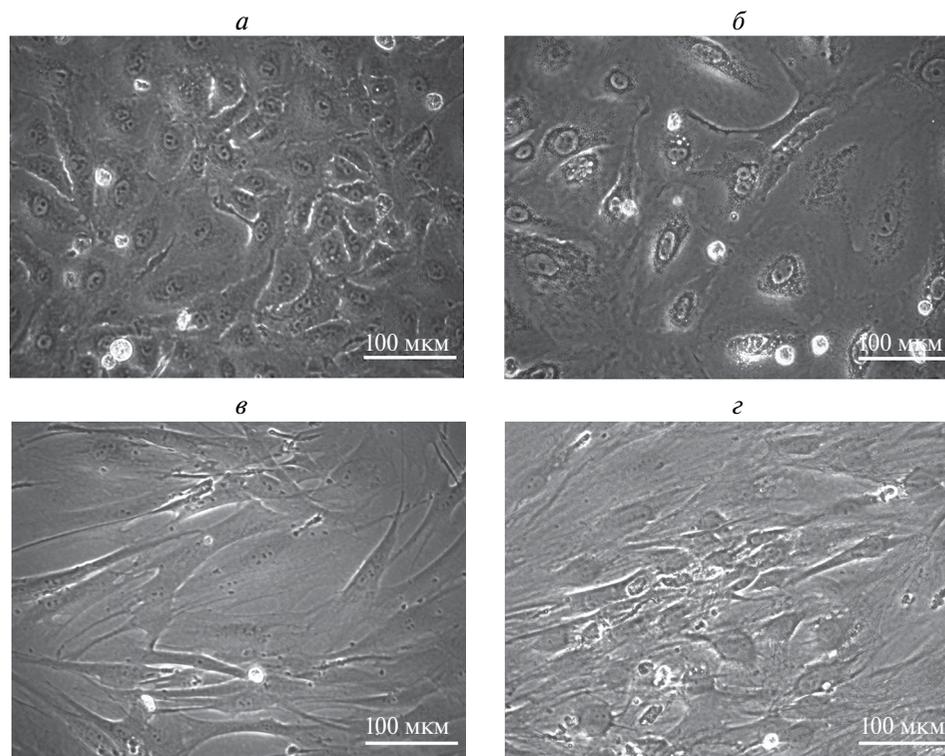


Рис. 1. Изменение морфологии клеток аденокарциномы A549 (а, б) и мезенхимных стволовых FRSN-1 (в, г) по мере клеточного старения, вызванного облучением. а, в — Контроль (без облучения); б, г — спустя 8 сут после облучения в дозе 10 Гр.

в клетках аденокарциномы линии A549 и мезенхимных стволовых клетках (МСК) линии MSC-DP. Среди необлученных A549 изредка встречались и клетки, содержащие значительные количества липофусциновых гранул, но большая их часть либо не содержала гранул вовсе, либо содержала в небольшом количестве, однако все облученные клетки содержали большие количества липофусциновых гранул (рис. 2а, б). У линии MSC-DP клетки с низким содержанием липофусцина встречаются как среди необлученных, так и среди облученных, но среди последних часты клетки с сильно выраженным фоном и скоплениями крупных округлых гранул липофусцина (рис. 2д, е). Облучение

в той же дозировке не оказало значительного эффекта на содержание липофусцина в клетках другой линии МСК — FRSN. Оказалось, что многие клетки этой линии даже без облучения содержали большие количества липофусцина (рис. 2в, з).

Изменение уровней экспрессии блокаторов клеточного цикла и участников SASP при клеточном старении, индуцируемом радиацией, у опухолевых и нормальных клеток. Уровень мРНК гена *CDKN2A*, кодирующего ингибитор циклин-зависимых киназ p16, участвующий в развитии и поддержании сенесцентного фенотипа, значимо повышен через 8 сут после ионизирующего облучения в дозе 10 Гр в клетках аденокарциномы легких линии

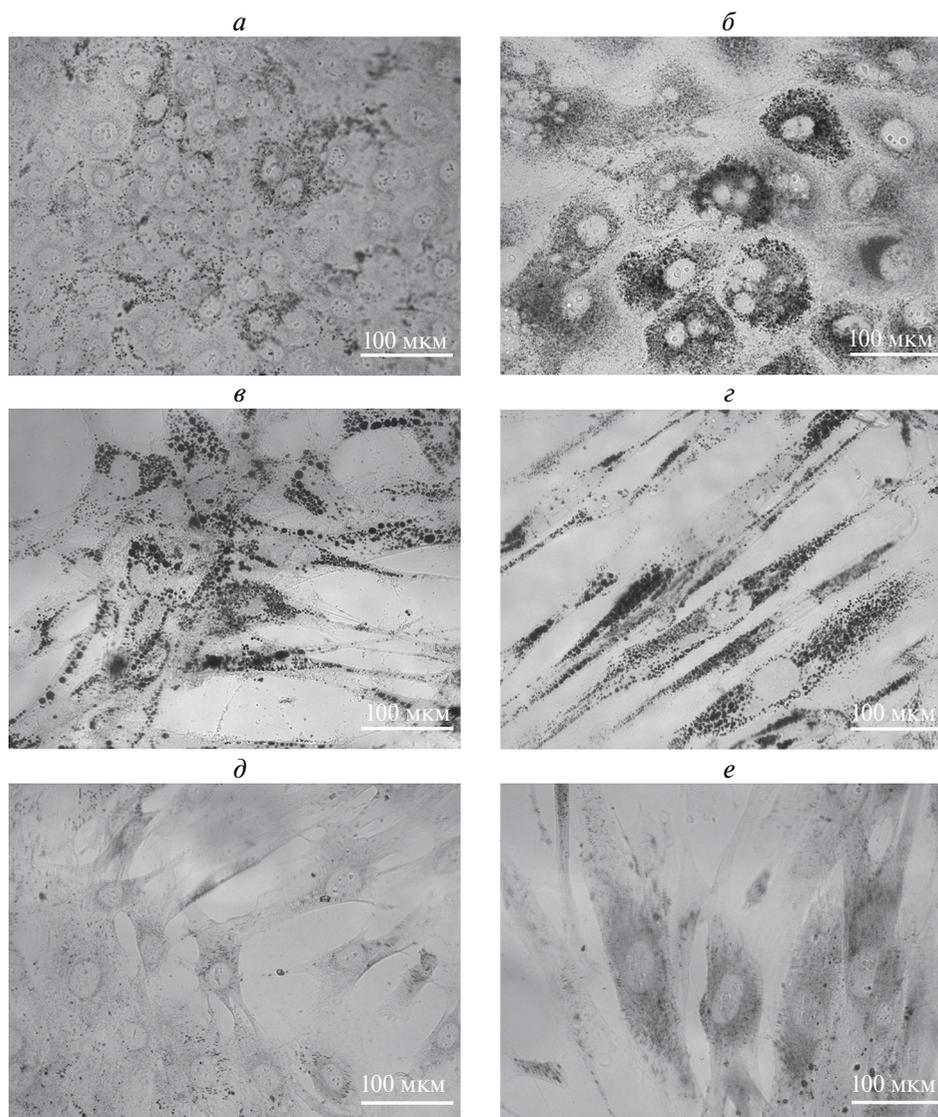


Рис. 2. Накопление липофусцина (черная окраска) в клетках A549 (а, б), а также мезенхимных стволовых FRSN (в, з) и MSC-DP (д, е), выявляемое окрашиванием суданом черным В. Левая колонка (а, в, д) — контроль (без облучения); правая колонка (б, з, е) — спустя 8 сут после облучения в дозе 10 Гр.

A549 и МСК линий FRSN-1 и MSC-DP, особенно в последней. При тех же условиях в МСК линии

FRSN уровень мРНК *CDKN2A* остался неизменным по сравнению с точкой до облучения (рис. 3).

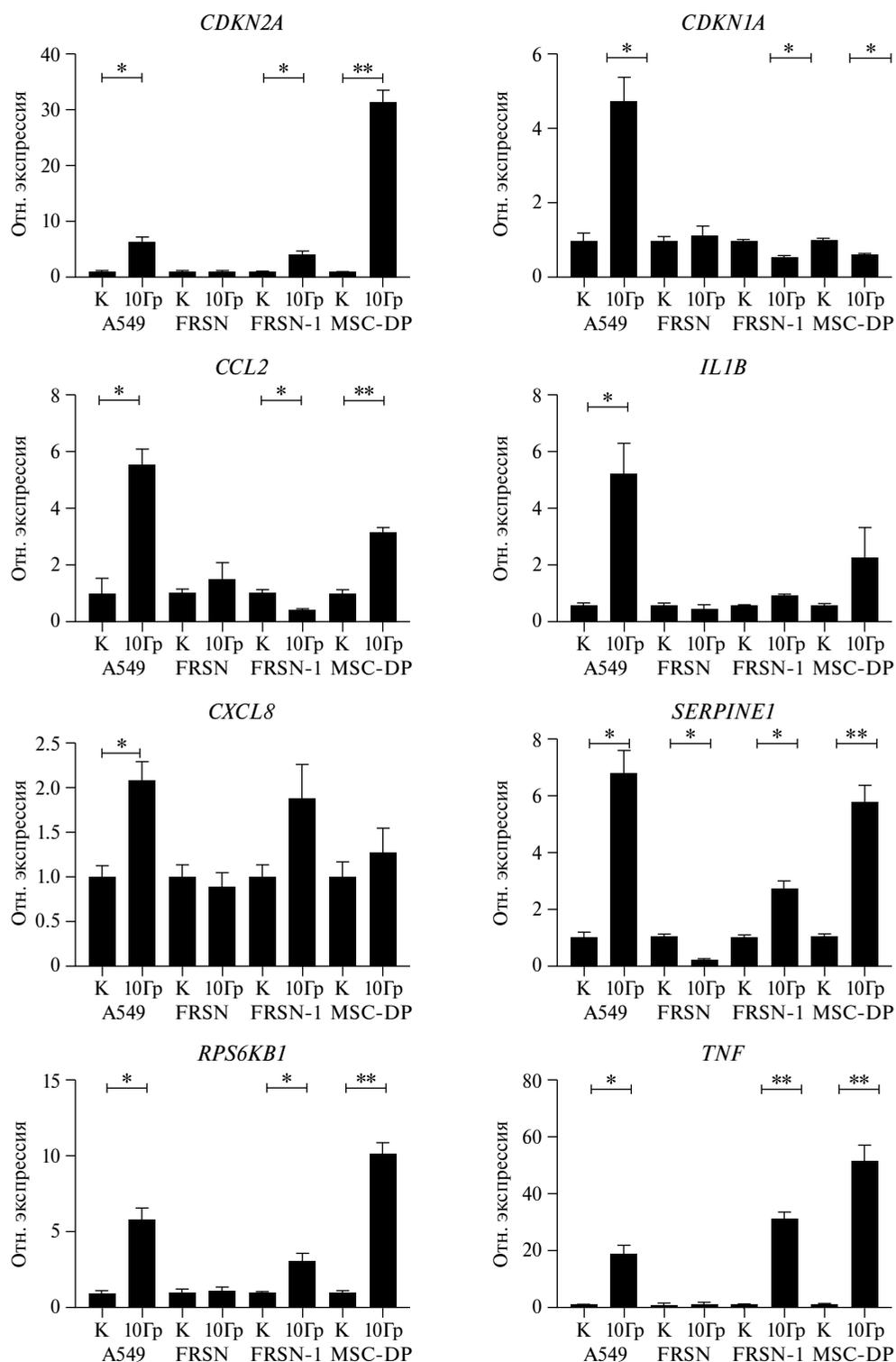


Рис. 3. Изменение уровней экспрессии генов белков-маркеров клеточного старения *CDKN2A*, *CDKN1A*, *CCL2*, *IL1B*, *CXCL8*, *SERPINE1*, *RPS6KB1* и *TNF* в клеточных линиях A549, FRSN, FRSN-1, MSC-DP в контроле (К) и через 8 сут после рентгеновского облучения в дозе 10 Гр. Результаты нормализованы по экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*, за единицу в каждом случае принимали уровень экспрессии в данной клеточной линии без облучения.

Уровень мРНК гена *CDKN1A*, кодирующего другой ингибитор циклин-зависимых киназ p21, на 8-е сут после облучения значимо повышен в A549, неизменен в FRSN и понижен в FRSN-1 и MSC-DP. Уровень мРНК *RPS6KB1*, участника каскада киназы mTOR, связанной с развитием сенесцентного фенотипа (Xiong et al., 2015), повышен в линиях A549, FRSN-1 и MSC-DP, особенно в MSC-DP. Из данных литературы следует, что экспрессия p21 является временным ответом на стрессовые агенты, приводящие к аресту клеточного цикла и далее к сенесцентности. Для поддержания сенесцентного фенотипа экспрессия p21 уже не требуется, в отличие от экспрессии p16 (Kumari, Jat, 2021), что согласуется с нашими данными.

Кроме того, показаны различия по экспрессии генов, кодирующих белки-участники SASP. Уровень мРНК входящих в SASP интерлейкинов *IL-1B* и *CXCL8* значимо повышен только в клетках A549. Уровень мРНК *CCL2* повышен в клетках A549 и MSC-DP, но значимо снижен в FRSN-1. Уровень мРНК *TNF* (фактора некроза опухоли, другого участника SASP) повышен в клетках A549, FRSN-1 и MSC-DP. Уровень мРНК *SERPINE1* (белок PAI-1) повышен в клетках A549, FRSN-1 и MSC-DP, но значимо снижен в клетках FRSN. Ранее было показано, что фенотип SASP может различаться у разных типов клеток и в случае разных стрессовых агентов, вызывающих сенесцентность (Kumari, Jat, 2021). Это подтверждается и нашими данными. Причины выявленных отличий требуют дальнейшего изучения.

Интересны отличия реакции МСК линии FRSN на облучение от реакции всех остальных линий. Клетки FRSN не изменяли значительно экспрессию генов маркерных белков клеточного старения. При этом уровень липофусцина, выявленный окрашиванием суданом черным, в этих клетках с самого начала был высоким по сравнению с остальными клеточными линиями и не изменился принципиально после облучения. Согласно паспорту (Коллекция культур клеток позвоночных. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), клетки FRSN имеют схожее происхождение с клетками FRSN-1, показавшими ожидаемый ответ на облучение, но они были взяты от более старшего донора и прошли в культуре большее количество пассажей, что может обуславливать наличие среди них большего числа клеток, близких

к репликативному старению или входящих в него при культивировании. Облучение популяции таких клеток останавливает ее пролиферацию и вводит оставшиеся несенесцентными делящиеся клетки в состояние индуцированного клеточного старения. Однако изменение экспрессии остальных маркеров клеточного старения в них остается малозаметным среди большого числа изначально сенесцентных клеток в популяции. Этот результат объясняет также отсутствие значительных изменений в ответе этих клеток на АФК. В связи с этим, оценивая выраженность и ожидаемость ответа трех изученных нами линий МСК человека, мы делаем вывод, что оптимальной моделью для индукции клеточного старения является линия МСК пульпы зуба MSC-DP.

Изменение уровней экспрессии генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе, при клеточном старении, индуцируемом радиацией, у опухолевых и нормальных клеток. Для большинства исследованных генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе, о которых пойдет речь далее, показан общий паттерн: они повышены на уровне мРНК спустя 8 сут в ответ на облучение в дозе 10 Гр в клетках линий A549, FRSN-1 и MSC-DP. Клетки линии FRSN на эту же дозу излучения реагировали иначе. Аполипопротеин Е (АpoЕ) — единственный из проанализированных маркеров, значимо поднимающийся в клетках FRSN (рис. 4). Он повышен и в остальных линиях, особенно в A549. Гены *DUOX1*, *GPX1*, *PRDX2* и особенно *SIRT2* повышаются в опухолевых A549 сильнее, чем в нормальных клетках FRSN-1 и MSC-DP. Гены *FAS*, *PRDX1*, *PRDX5*, *SOD1* и особенно *NOS2* повышаются в МСК больше, чем в опухолевых клетках.

Свободные радикалы образуются в процессе жизнедеятельности клеток, а также поступают из внешней среды (Finkel, 2011). Супероксидный анион-радикал считается исходной АФК, образуемой комплексами I и III дыхательной цепи митохондрий. Этот радикал с помощью фермента СОД преобразуется в перекись водорода, которая затем превращается в воду с помощью каталазы или глутатионпероксидазы. СОД, каталаза, глутатионпероксидазы и пероксиредоксины являются наиболее важными антиоксидантными ферментами, играющими ключевую роль в окислительно-восстановительном гомеостазе.

Что касается возможного объяснения наблюдаемого нами повышения экспрессии гена *APOE*

(белка ApoE), то ранее сообщалось, что этот белок может функционировать как дестабилизатор гетерохроматина. В частности, повышенный уровень ApoE приводит к деградации белков ядерной ламина и гетерохроматин-ассоциированного белка KRAB-ассоциированного белка 1 по аутофагически-лизосомальному пути, тем самым разрушая гетерохроматин и способствуя клеточному старению (Zhao et al., 2022). Связь индуцируемой сенесцентности с процессом аутофагии будет предметом нашего дальнейшего исследования. Мы наблюдали увеличение экспрессии *APOE* во всех изучаемых клетках, как опухолевых, так и нормальных (рис. 4).

Мы наблюдали существенный рост экспрессии *FAS* в ответ на облучение и приобретение сенесцентности, особенно в нормальных клетках (рис. 4). Хорошо известно, что повреждение ДНК может приводить к апоптозу. Поэтому нарушение апоптотической программы может способствовать сохранению в популяции клеток с поврежденной ДНК, в том числе и клеток, вошедших в связи с этим в состояние клеточного старения.

В недавней работе было обнаружено, что у мышей с мутантным рецептором Fas наблюдается повышенное повреждение ДНК и преждевременное старение клеток, а также уменьшенное количество апоптотических везикул (Huang et al., 2024). Увеличенную экспрессию гена *FAS* связывают с активацией апоптоза (Yoshikawa et al., 2008), а одним из общеизвестных свойств сенесцентных клеток является повышенная устойчивость к апоптозу. Мы предполагаем, что наблюдаемое нами увеличение экспрессии *FAS* в популяции облученных клеток объясняется тем, что растет доля устойчивых к апоптозу сенесцентных клеток, в которых экспрессия *FAS* может подняться до уровня, при котором несенесцентная клетка с большой вероятностью ушла бы в апоптоз. Это предположение требует дальнейшей проверки.

В регуляции редокс-гомеостаза клеток участвуют также белки семейства сиртуинов (Ziętara et al., 2022). Они играют важную роль в механизмах антиоксидантной защиты, предотвращают повреждение ДНК, воспалительные реакции и образование раковых клеток (Watroba, Szukiewicz, 2021). Представители семейства SIRT относятся к NAD^+ -зависимым деацетилазам, которые регулируют продолжительность жизни и вовлечены в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний

(Camici et al., 2015; Winnik et al., 2015; Covarrubias et al., 2021). SIRT2, уровень которого мы измеряли, преимущественно локализуется в цитоплазме, но перемещается в ядро и митохондрии при стрессе (Eskandarian et al., 2013; Liu et al., 2017; Grootaert, Bennett, 2022). Эпигенетический фактор SIRT2 снижает ацетилирование гистонов и негистоновых белков (Chen et al., 2020; Sun et al., 2023).

Исследования, проведенные в последние годы, выявили ключевую роль SIRT2 в увеличении продолжительности жизни и подавлении вызванного старением функционального снижения функций различных органов (North et al., 2014; Tang et al., 2017; He et al., 2020). Мы наблюдали в ответ на индуцированное облучением клеточное старение, повышение экспрессии SIRT2 у раковых клеток более чем на порядок, у нормальных MSC-DP — в несколько раз. Вероятно, повышение экспрессии SIRT2 важно для антиоксидантной защиты клеток (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опухолевые и нормальные клетки реагируют на развитие сенесцентности по-разному: продуцируют разный SASP и по-разному меняют экспрессию генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе. Экспрессия *DUOX1*, *GPX1*, *PRDX2* и *SIRT2* повышается в опухолевых A549 сильнее, чем в МСК. Экспрессия *FAS*, *PRDX1*, *PRDX5*, *SOD1* и *NOS2* повышается в МСК сильнее, чем в опухолевых клетках. Изучение различий в реакции нормальных и опухолевых клеток на АФК позволит сделать лучевую терапию более эффективной, минимизировав ее разрушающий эффект на окружающие здоровые клетки.

Анализ индукции клеточного старения трех разных линий МСК человека в ответ на рентгеновское облучение показал, что клетки линии FRSN демонстрируют слабый и отличный от других линий МСК ответ на облучение, что делает их дальнейшее использование для исследования механизмов клеточного старения нецелесообразным. Из двух других линий (с ожидаемым ответом на облучение) наиболее выраженную реакцию продемонстрировали клетки MSC-DP (пульпы зуба человека), которые и представляются наиболее предпочтительной моделью для изучения старения МСК человека.

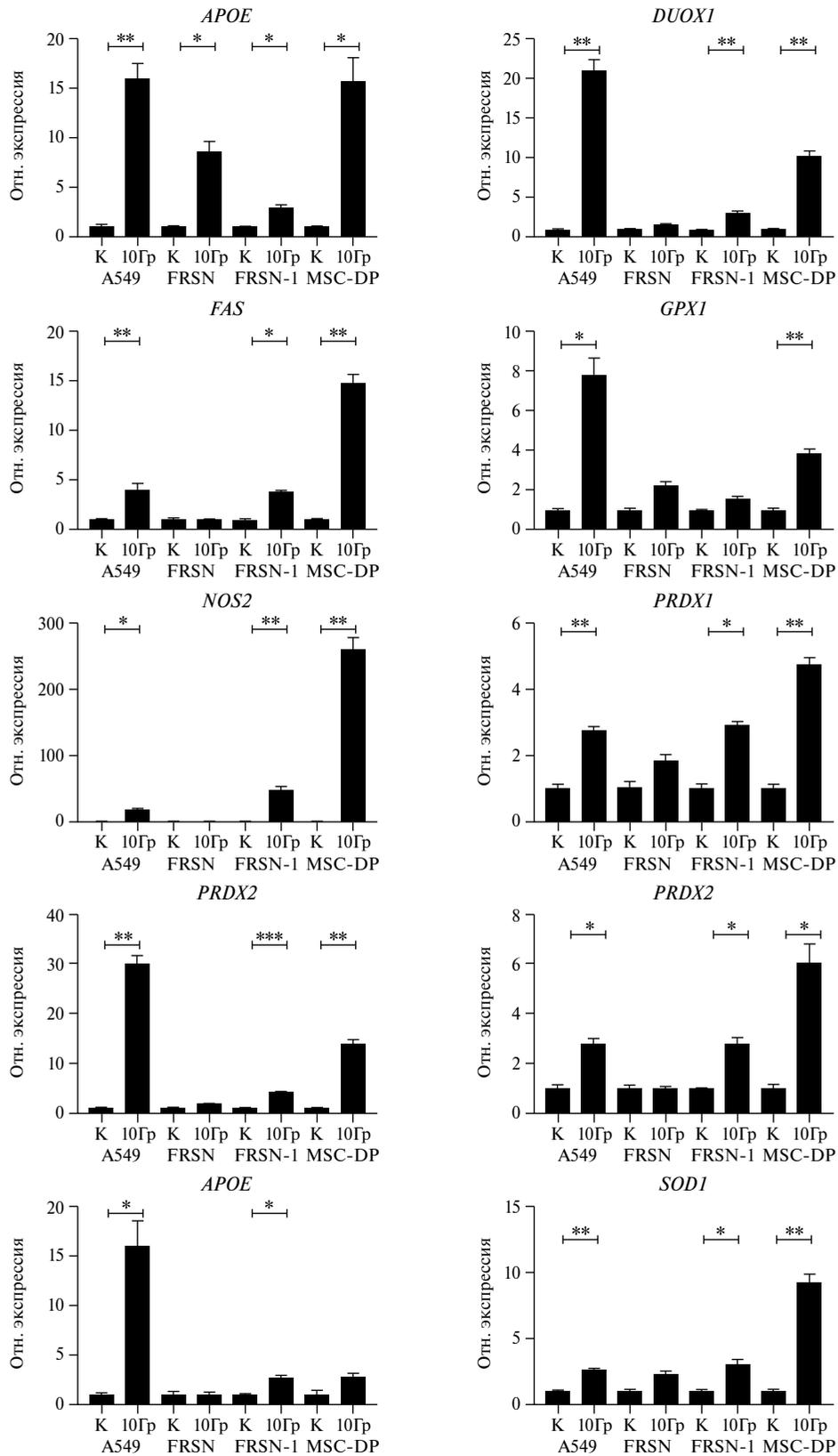


Рис. 4. Изменение уровней экспрессии генов белков, участвующих в редокс-гомеостазе, *APOE*, *DUOX1*, *FAS*, *GPX1*, *NOS2*, *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX5*, *SIRT2* и *SOD1*, нормализованной по экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*, в клеточных линиях A549, FRSN, FRSN-1, MSC-DP спустя 8 сут после рентгеновского облучения в дозировке 10 Гр. За единицу в каждом случае принимали уровень экспрессии в данной клеточной линии без облучения

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не участвовали животные или люди в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Angsutararux P., Luanpitpong S., Issaragrisil S.* 2015. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* V. 2015. Art. ID: 795602. <https://doi.org/10.1155/2015/795602>
- Azzam E. I., Jay-Gerin J.-P., Pain D.* 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters.* V. 327. P. 48. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
- Baker D. J., Wijshake T., Tchkonina T., LeBrasseur N.K., Childs B. G., Sluis B. van de, Kirkland J. L., Deursen J. M., van.* 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* V. 479. P. 232. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- Beausejour C. M.* 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* V. 22. P. 4212. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>
- Camici G. G., Savarese G., Akhmedov A., Lüscher T. F.* 2015. Molecular mechanism of endothelial and vascular aging: implications for cardiovascular disease. *Eur. Heart. J.* V. 36. P. 3392. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv587>
- Chen X.-F., Chen X., Tang X.* 2020. Short-chain fatty acid, acylation and cardiovascular diseases. *Clin. Sci. (Lond).* V. 134. P. 657. <https://doi.org/10.1042/CS20200128>
- Cheung E. C., Vousden K. H.* 2022. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat. Rev. Cancer.* V. 22. P. 280. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
- Chukavin N. N., Filippova K. O., Ermakov A. M., Karmanova E. E., Popova N. R., Anikina V. A., Ivanova O. S., Ivanov V. K., Popov A. L.* 2023. Redox-active cerium fluoride nanoparticles selectively modulate cellular response against X-ray irradiation in vitro. *Biomed. V. 12.* P. 11. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010011>
- Covarrubias A. J., Perrone R., Grozio A., Verdin E.* 2021. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 22. P. 119. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00313-x>
- Crescenzi E., Pacifico F., Lavorgna A., De Palma R., D'Aiuto E., Palumbo G., Formisano S., Leonardi A.* 2011. NF- κ B-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. *Oncogene.* V. 30. P. 2707. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.1>
- Davalli P., Mitic T., Caporali A., Lauriola A., D'Arca D.* 2016. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 2016. Art. ID: 3565127. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>
- Eskandarian H. A., Impens F., Nahori M.-A., Soubigou G., Coppée J.-Y., Cossart P., Hamon M. A.* 2013. A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science.* V. 341. Art. ID: 1238858. <https://doi.org/10.1126/science.1238858>
- Evangelou K., Gorgoulis V. G.* 2017. Sudan black B, the specific histochemical stain for lipofuscin: a novel method to detect senescent cells. *Methods Mol. Biol.* V. 1534. P. 111. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7_10
- Finkel T.* 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* V. 194. P. 7. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>
- Gems D., Kern C. C.* 2022. Is “cellular senescence” a misnomer? *GeroScience.* V. 44. P. 2461. <https://doi.org/10.1007/s11357-022-00652-x>
- Gorgoulis V., Adams P. D., Alimonti A., Bennett D. C., Bischof O., Bishop C., Campisi J., Collado M., Evangelou K., Ferbeyre G., Gil J., Hara E., Krizhanovskiy V., Jurk D., Maier A. B., Narita M., Niedernhofer L., Passos J. F., Robbins P. D., Schmitt C. A., Sedivy J., Vougas K., Zglinicki T., von, Zhou D., Serrano M., Demaria M.* 2019. Cellular Senescence: defining a path forward. *Cell.* V. 179. P. 813. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Grootaert M. O. J., Bennett M. R.* 2022. Sirtuins in atherosclerosis: guardians of healthspan and therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* V. 19. P. 668. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00685-x>
- Harman D.* 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* V. 11. P. 298. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- He M., Chiang H.-H., Luo H., Zheng Z., Qiao Q., Wang L., Tan M., Ohkubo R., Mu W.-C., Zhao S., Wu H., Chen D.* 2020. An acetylation switch of the NLRP3 inflammasome regulates aging-associated chronic inflammation and insulin resistance. *Cell Metab.* V. 31. P. 580. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.009>

- Höhn A., Jung T., Grimm S., Grune T. 2010. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: Role in senescent cells. *Free Rad. Biol. Med.* V. 48. P. 1100.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.030>
- Holmström K.M., Finkel T. 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* V. 15. P. 411.
<https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Huang Z., Zhuang Y., Li W., Ma M., Lei F., Qu Y., Li J., Luo H., Li C., Lu L., Ma L., Zhang X., Kou X., Jiang L., Mao X., Shi S. 2024. Apoptotic vesicles are required to repair DNA damage and suppress premature cellular senescence. *J. Extracell. Vesicles.* V. 13. Art. ID: e12428.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12428>
- Ibragimova M., Kussainova A., Aripova A., Bersimbaev R., Bulgakova O. 2024. The molecular mechanisms in senescent cells induced by natural aging and ionizing radiation. *Cells.* V. 13. Art. ID: 550.
<https://doi.org/10.3390/cells13060550>
- Jager T.L., de Cockrell A.E., Du Plessis S.S. 2017. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Adv. Exp. Med. Biol.* V. 996. P. 15.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_2
- Jomova K., Raptova R., Alomar S.Y., Alwasel S.H., Nepovimova E., Kuca K., Valko M. 2023. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch. Toxicol.* V. 97. P. 2499.
<https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>
- Kumari R., Jat P. 2021. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front. Cell. Dev. Biol.* V. 9. Art. ID: 645593.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645593>
- Lapasset L., Milhavel O., Prieur A., Besnard E., Babled A., Ait-Hamou N., Leschik J., Pellestor F., Ramirez J.-M., De Vos J., Lehmann S., Lemaitre J.-M. 2011. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* V. 25. P. 2248.
<https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>
- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* V. 13. P. 757.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- Liu G., Park S.-H., Imbesi M., Nathan W.J., Zou X., Zhu Y., Jiang H., Parisiadou L., Gius D. 2017. Loss of NAD-dependent protein deacetylase Sirtuin-2 alters mitochondrial protein acetylation and dysregulates mitophagy. *Antioxid. Redox. Signal.* V. 26. P. 849.
<https://doi.org/10.1089/ars.2016.6662>
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. 2023. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell.* V. 186. P. 243.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Milanovic M., Fan D.N.Y., Belenki D., Däbritz J.H. M., Zhao Z., Yu Y., Dörr J.R., Dimitrova L., Lenze D., Monteiro Barbosa I.A., Mendoza-Parra M.A., Kanashova T., Metzner M., Pardon K., Reimann M., Trumpp A., Dörken B., Zuber J., Gronemeyer H., Hummel M., Dittmar G., Lee S., Schmitt C.A. 2018. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature.* V. 553. P. 96.
<https://doi.org/10.1038/nature25167>
- North B.J., Rosenberg M.A., Jeganathan K.B., Hafner A.V., Michan S., Dai J., Baker D.J., Cen Y., Wu L.E., Sauve A.A., Deursen J.M., van, Rosenzweig A., Sinclair D.A. 2014. SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. *EMBO J.* V. 33. P. 1438.
<https://doi.org/10.15252/embj.201386907>
- Reimann M., Lee S., Schmitt C.A. 2024. Cellular senescence: neither irreversible nor reversible. *Exp. Med.* V. 221. Art. ID: e20232136.
<https://doi.org/10.1084/jem.20232136>
- Sun X., Zhang Y., Chen X.-F., Tang X. 2023. Acylations in cardiovascular biology and diseases, what's beyond acetylation. *EBioMedicine.* V. 87. Art. ID: 104418.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104418>
- Tang X., Chen X.-F., Wang N.-Y., Wang X.-M., Liang S.-T., Zheng W., Lu Y.-B., Zhao X., Hao D.-L., Zhang Z.-Q., Zou M.-H., Liu D.-P., Chen H.-Z. 2017. SIRT2 acts as a cardioprotective deacetylase in pathological cardiac hypertrophy. *Circulation.* V. 136. P. 2051.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028728>
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* V. 39. P. 44.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Watroba M., Szukiewicz D. 2021. Sirtuins at the service of healthy longevity. *Front. Physiol.* V. 12. Art. ID: 724506.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.724506>
- Winnik S., Auwerx J., Sinclair D.A., Matter C.M. 2015. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Eur. Heart J.* V. 36. P. 3404.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv290>
- Xiong Y., Yepuri G., Forbitech M., Yu Y., Montani J.-P., Yang Z., Ming X.-F. 2015. ARG2 impairs endothelial autophagy through regulation of MTOR and PRKAA/AMPK signaling in advanced atherosclerosis. *Autophagy.* V. 10. P. 2223.
<https://doi.org/10.4161/15548627.2014.981789>

- Yoshikawa T., Saito H., Osaki T., Matsumoto S., Tsujitani S., Ikeguchi M. 2008. Elevated Fas expression is related to increased apoptosis of circulating CD8⁺ T cell in patients with gastric cancer. *J. Surg. Res.* V. 148. P. 143. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.07.011>
- Zhao H., Ji Q., Wu Z., Wang S., Ren J., Yan K., Wang Z., Hu J., Chu Q., Hu H., Cai Y., Wang Q., Huang D., Ji Z., Li J., Belmonte J. C.I., Song M., Zhang W., Qu J., Liu G.-H. 2022. Destabilizing heterochromatin by APOE mediates senescence. *Nat. Aging.* V. 2. P. 303. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00186-z>
- Ziętara P., Dziewięcka M., Augustyniak M. 2022. Why is longevity still a scientific mystery? Sirtuins-past, present and future. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 728. <https://doi.org/10.3390/ijms24010728>

INCREASED EXPRESSION OF ROS-RESPONSIVE GENES IN TUMOR AND NORMAL CELLS DURING IRRADIATION-INDUCED SENESCENCE

A. P. Rodimtsev*, G. I. Blinova, E. N. Tolkunova

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia

* e-mail: a. p.rod@mail.ru

Objective: A high level of reactive oxygen species in a cell can be both a consequence and a cause of cellular senescence. The response of tumor and normal cells to irradiation-induced senescence is similar, but differs in detail. Exploring these differences may provide a key to improving the effectiveness and safety of radiation therapy. **Methods:** We induced senescence in A549 adenocarcinoma cells and normal mesenchymal stem cells with irradiation and evaluated changes in morphology, lipofuscin accumulation, and gene expression. **Results:** The expression of *DUOX1*, *GPX1*, *PRDX2* and *SIRT2* is more strongly increased in A549 tumor cells, while the expression of *FAS*, *PRDX1*, *PRDX5*, *SOD1* and *NOS2* is stronger in normal cells. **Conclusion:** Tumor and normal cells react to the development of the senescent phenotype in different ways — they produce different SASP and activate ROS response systems in cell type-specific manner.

Keywords: cellular senescence, reactive oxygen species, induced irradiation