

**ГЕРГАНА ДИМИТРОВА САВОВА**

**МОДИФИКАТОРИ НА РАДИАЦИОННИЯ  
КЛЕТЪЧЕН ОТГОВОР, МОЛЕКУЛНИ  
МЕХАНИЗМИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на научна и образователна степен  
„Доктор“

Област на Висшето образование: 4. Природни науки, математика и  
информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Радиобиология

Научен ръководител: проф. д-р РАЙНА БОТЕВА, дхн

София, 2020

Дисертационният труд съдържа 147 страници, 32 фигури и 13 таблици, разделени в 5 раздела. В библиографската справка са включени 233 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на Научния колегиум при НЦРРЗ на 21.11.2019 г.

Научно жури:

1. доц. д-р Жана Николаева Джунова – Великова, дм
2. доц. Росица Петрова Христова, дм
3. проф. Райна Николаева Шипарова – Ботева, дхн
4. проф. Радостина Тенева Георгиева, дмн
5. проф. д-р Василий Николаевич Гольцев

Председател на журито: доц. Росица Петрова Христова, дм

Официални рецензенти: доц. Росица Петрова Христова, дм

проф. Радостина Тенева Георгиева, дмн

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 11.03.2020 г. от 13 часа в зала 225 на НЦРРЗ, ул. „Георги Софийски“ №3, сграда 7, София.

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Научно-учебен“ към НЦРРЗ.

## СЪДЪРЖАНИЕ

1	УВОД.....	4
2	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	5
3	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	6
3.1	Репаративен капацитет на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в човешки моонуклеарни клетки. Ефекти на инхибитора на молекулния шаперон Hsp90, гелданамицин и на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин върху нивата на персистиращите двойноверижни скъсвания.....	6
3.2	Нива на възпалителни цитокини, секретирани от <i>in vitro</i> облъчени периферни кръвни моонуклеарни клетки. Ефекти на гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин върху секрецията на цитокини.....	6
3.3	Ефекти на гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин върху нивата на транскрипционния фактор NF-κB и на неговия негативен регулатор, киназата IκBα в облъчени периферни кръвни моонуклеарни клетки.....	6
3.4	Зависимост между мутацията -94ins/del AATTG в промоторния регион на NF-κB гена и риска от сърдечно-съдово заболяване при професионално облъчени работници от АЕЦ „Козлодуй“ и необлъчени контроли.....	7
4	РЕЗУЛТАТИ.....	8
4.1	Роля на молекулния шаперон Hsp90 в репарацията на радиационно-индуцирани повреди в ДНК.....	8
4.2	Роля на протеазома в репарацията на радиационно-индуцирани повреди в ДНК.....	9
4.3	Радиационно-индуциран възпалителен отговор, ефекти на инхибитори на молекулния шаперон Hsp90 и на протеазома върху секрецията на цитокини след <i>in vitro</i> облъчване на клетките.....	11
4.4	Ефекти на молекулния шаперон Hsp90 и на протеазома върху количеството и активността на транскрипционния фактор NF-κB и върху активността на киназата IκBα в облъчени моонуклеарни кръвни клетки.....	15
4.5	Значение на мутацията -94 ins/del AATTG в промоторния регион на NF-κB1 гена и връзка с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания.....	17
5	ДИСКУСИЯ.....	20
5.1	Инхибитори на молекулния шаперон Hsp90 и на протеазома са ефективни модификатори на репаративния клетъчен отговор.....	20
5.2	Гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин са ефективни модификатори на възпалителния отговор като част от клетъчния отговор към радиационно въздействие.....	24
5.3	Връзка между полиморфизъм в NFκB1 гена, професионално излагане на ниски дози ЙЛ и повишен риск от развитие на сърдечно-съдово заболяване.....	26
	ИЗВОДИ.....	29
	ПРИНОСИ.....	30
	НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ.....	31
	УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ.....	31
	ЛИТЕРАТУРА.....	33
	Summary.....	36

# 1 УВОД

Цитотоксичното действие на йонизиращите лъчения (ЙЛ) се свързва предимно с двойноверижни разкъсвания в молекулата на ДНК, които ако не бъдат поправени, застрашават интегритета на генома и могат да имат летални последици за клетките. Поради тази причина репарацията на радиационно-индуцирани повреди в ДНК включва сумарно всички клетъчни процеси с участието на протеини, ензими, мембрани и малки молекули, които имат за цел преодоляване на последиците от радиационното въздействие. Възпалителният отговор също е част от радиационния отговор на клетката. В резултат на облъчването настъпват промени в отговора на имунната система, които водят до промени в профила на цитокините, разтворими полипептиди, които участват в почти всеки аспект на имунитета и възпалението.

Използването на инхибитори на молекулни шаперони, отговарящи за стабилизацията и активирането на редица белтъци, както и на инхибитори на протеазома, мултикаталитичен комплекс от протеази, отговорни за разграждането на важни вътреклетъчни протеини и ензими, имат съществено значение в лъчетерапията на малигнени заболявания. Интересното действие на тези инхибитори се крие в двойствената им природа – от една страна приложени в комбинация с химио- или лъчетерапия имат сенсibiliзиращ ефект върху туморни клетки, но от друга страна могат да протектират нормални кръвни клетки при гама облъчване.

В първата част на този дисертационен труд е разгледана ролята на четири модификатора на радиационния отговор – инхибиторът на шаперона Hsp90, гелданамицин и протеазомните инхибитори MG132, целасрол и лактацистин. Изследвани са биологичните им ефекти върху репаративния отговор чрез параметъра “Tail Moment” и върху възпалителния отговор по нива на цитокините IL-6, IL-8, IL-10 и TNF $\alpha$ . Беше установено, че гелданамицинът и протеазомните инхибитори могат да модифицират радиационния и възпалителния отговор като активират механизми, които повишават резистентността на облъчените клетки, което ги характеризира като радиопротектори.

Втората част на настоящото изследване представлява молекулярно-епидемиологичен анализ, свързан с мониторинг на риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване в резултат от професионално облъчване с ниски дози йонизиращи лъчения. За целта бяха анализирани плазмените нива на разтворимата фракция на протеина ST2 (sST2) в ролята му на прогностичен биомаркер за сърдечна недостатъчност и беше потвърдена зависимост между мутацията -94ins/del ATTG в промоторния регион на NF- $\kappa$ B1 гена и риска от сърдечно-съдови заболявания при работници от АЕЦ „Козлодуй“.

## 2 ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Основна цел на настоящото изследване е да се анализира модифициращото действие на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин и на инхибитора на молекулярния шаперон Hsp90, гелданамицин, върху репаративния и възпалителния отговор на облъчени мононуклеарни клетки от човешка периферна кръв.

За изпълнението на поставената цел, бяха формулирани следните задачи:

1. Анализ на модифициращото действие на гелданамицин, инхибитор на молекулярния шаперон Hsp90 и на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин върху репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в ДНК от човешки мононуклеарни клетки.
2. Анализ на ефектите на гелданамицин и на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин върху възпалителния отговор на мононуклеарни клетки от човешка периферна кръв, облъчени с  $\gamma$ -ЙЛ.
3. Изследване на промени в нивата и активността на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B и на активността на неговия негативен регулатор, киназата I $\kappa$ B $\alpha$ , индуцирани от инхибиторите гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин в облъчени мононуклеарни кръвни клетки.
4. Изследване на зависимост между мутацията -94ins/del ATTG в промоторния регион на NF- $\kappa$ B1 гена и риска от сърдечно-съдови заболявания при работници от АЕЦ „Козлодуй“, определен по плазмени нива на сърдечния маркер sST2.

### **3 МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

**3.1 Репаративен капацитет на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в човешки моноклеарни клетки. Ефекти на инхибитора на молекулярния шаперон Hsp90, гелданамицин и на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин върху нивата на персистиращите двойноверижни скъсвания.**

3.1.1 Изолране на моноклеарни клетки от периферна кръв.

3.1.2 Неутрален комет тест за определяне на двойноверижните скъсвания в ДНК молекули на моноклеарни клетки от периферна кръв. Клетките бяха третирани с 0.1  $\mu\text{M}$  гелданамицин, 0.1  $\mu\text{M}$  целастрол, 0.1  $\mu\text{M}$  MG132 или 1  $\mu\text{M}$  лактацистин в продължение на 2 часа, след което *in vitro* облъчени с 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ (мощност на дозата 0.5 Gy/min). За комбинирано третираните с инхибиторите и с инхибитора на киназата DNA-PKcs (NU7026) в продължение на 30 мин преди облъчване, репаративната кинетика беше проследена на три времеви интервала след облъчването – 0, 10 и 60 мин.

3.1.3 Визуализиране на „кометите“ – с помощта на епифлуоресцентен микроскоп след оцветяване на „кометите“ с етидиев бромид.

3.1.4 Статистически анализ на данните.

**3.2 Нива на възпалителни цитокини, секретирани от *in vitro* облъчени периферни кръвни моноклеарни клетки. Ефекти на гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин върху секрецията на цитокини.**

3.2.1 Изолране на моноклеарни клетки от периферна кръв.

3.2.2 Имунохимичен анализ (ELISA) на екстрацелуларните нива на провъзпалителните цитокини IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  и на антивъзпалителния цитокин IL-10 след третиране на клетките с 0.1  $\mu\text{M}$  гелданамицин, 0.1  $\mu\text{M}$  целастрол, 0.1  $\mu\text{M}$  MG132 или 1  $\mu\text{M}$  лактацистин в продължение на 2 часа и последващо *in vitro* облъчване с 0.5 или 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ (мощност на дозата 0.5 Gy/min). Нивата на изследваните цитокини от клетъчни супернатанти бяха определени на четири времеви интервала – 0, 2, 4 и 24 часа след облъчването на клетките.

3.2.3 Статистически анализ на данните.

**3.3 Ефекти на гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин върху нивата на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B и на неговия негативен регулатор, киназата I $\kappa$ B $\alpha$  в облъчени периферни кръвни моноклеарни клетки.**

3.3.1 Изолране на моноклеарни клетки от периферна кръв.

- 3.3.2 Имунохимичен анализ (ELISA) на тоталното съдържимо и фосфорилираната форма на NF-кВ p65 (Ser 536) и на фосфорилиран IкВ $\alpha$  (Ser 32/36) на 24-ти час в клетъчни лизати след третиране на клетките с 0.1  $\mu$ M гелданамицин, 0.1  $\mu$ M целастрол, 0.1  $\mu$ M MG132 или 1  $\mu$ M лактацистин в продължение на 2 часа и последващо *in vitro* облъчване с 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ (мощност на дозата 0.5 Gy/min).
- 3.3.3 Статистически анализ на данните.

### **3.4 Зависимост между мутацията -94ins/del АТТG в промоторния регион на NF-кВ гена и риска от сърдечно-съдово заболяване при професионално облъчени работници от АЕЦ „Козлодуй“ и необлъчени контроли.**

- 3.4.1 Дизайн на изследването и формиране на групите. В изследването бяха включени две групи: 45 професионално облъчени с ниски дози работника от АЕЦ „Козлодуй“ и 24 лица, за които няма данни за професионално облъчване. Участниците в двете групи са сравними по социален статус и образование.
- 3.4.2 Изолиране на плазма от периферна кръв на изследваните лица.
- 3.4.3 Имунохимичен анализ (ELISA) на разтворимата фракция на сърдечния биомаркер ST2 (sST2). Статистически анализ на експерименталните данни.
- 3.4.4 Изолиране на ДНК на изследваните лица.
- 3.4.5 Установяване на генетичните профили по търсения полиморфизъм с помощта на Real-Time PCR метод, последващ High Resolution Melting Analysis и секвенционна реакция.

## 4 РЕЗУЛТАТИ

### 4.1 Роля на молекулния шаперон Hsp90 в репарацията на радиационно-индуцирани повреди в ДНК.

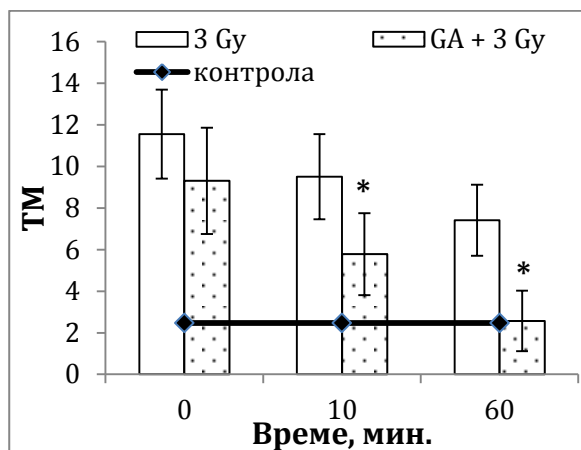
Молекулният шаперон Hsp90 има ключова роля за стабилизацията и активирането на огромен брой протеини и ензими, между които са важни транскрипционни фактори и кинази, които участват в клетъчния радиационен отговор. Настоящото изследване за пръв път представя експериментални доказателства, че инхибирането на Hsp90, което обикновено се свързва със сенсibiliзиране на туморните клетки, оказва радиопротективен ефект върху нормалните клетки като стимулира репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в мононуклеарни клетки от периферна кръв.

Облъчването на клетките с 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ увеличава около 5 пъти нивата на двойноверижните повреди (DSB) в ДНК, без да засяга клетъчната жизнеспособност. Разликата в репаративните кинетики на клетки, в които Hsp90 е инхибиран от гелданамицин (GA) и клетки, които не са третирани с GA и които съдържат активен Hsp90, е съществена (Фигура 1А). 10 мин след облъчването на клетките, приблизително половината DSB в третираните с GA проби са поправени, а в рамките на 60 мин репарацията е завършена, докато в облъчените, но нетретирани с GA проби, за същото време от 60 мин ~50% от DSB остават непоправени.

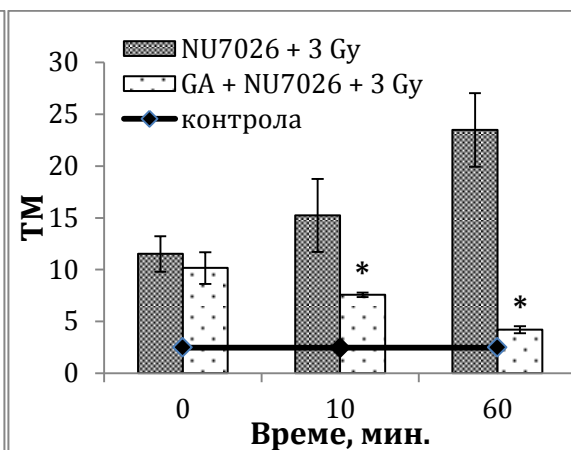
Киназата DNA-PK<sub>CS</sub> образува комплекс с шаперона Hsp90 и е ключов ензим в нехомоложната репарация (NHEJ), основен механизъм за поправка на DSB. На базата на тези данни ние предположихме, че вероятно стимулиращият ефект на GA върху репарацията на радиационно-индуцирани DSB, може да бъде обяснен с активиране на DNA-PK<sub>CS</sub>. За да потвърдим тази хипотеза, анализирахме кинетиката на ДНК репарация след специфично инхибиране на каталитичната активност на DNA-PK<sub>CS</sub>, като използвахме инхибитора NU7026, който се свързва в АТФ-свързващото място на ензима и блокира киназната ѝ активност. Както е показано на фигура 1Б, инхибирането на DNA-PK<sub>CS</sub> от NU7026 не засяга магнитуда на радиационно-индуцираните повреди, но блокира репарацията, което рефлектира във фрагментация на ДНК молекулите. Бяха регистрирани статистически значими разлики в репаративните кинетики, измерени в присъствие и отсъствие на инхибитора NU7026, което потвърждава ключовата роля на DNA-PK<sub>CS</sub> в ДНК репарацията. Също така предварителното третиране с GA напълно блокира фрагментацията на ДНК, регистрирана след инхибиране на DNA-PK<sub>CS</sub> и стимулира репаративните процеси дори в присъствие на NU7026. 60 мин след облъчването на тези клетки, репарацията е почти завършена и е постигната значително по-висока степен на възстановяване на интегритета на ДНК.



А)



Б)

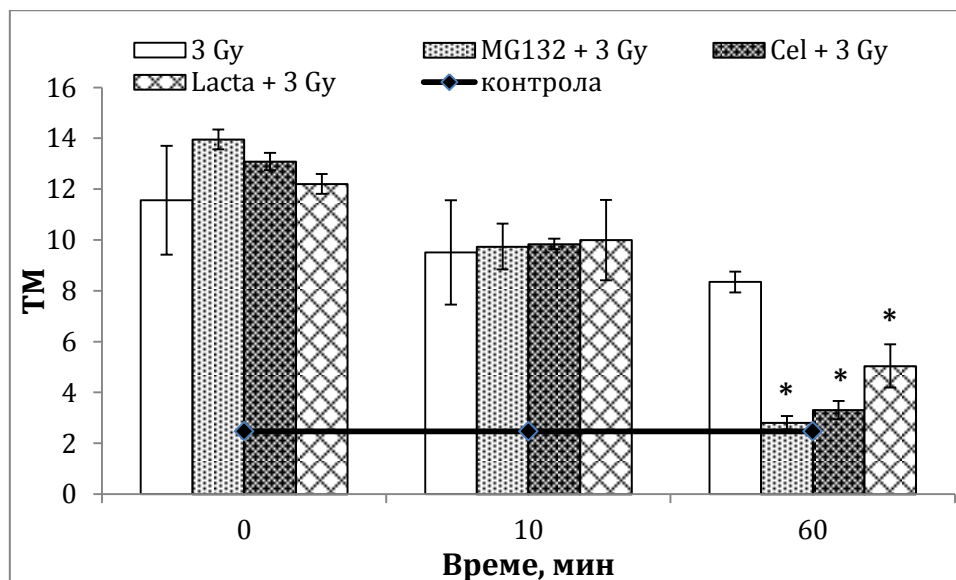


**Фигура 1.** Ефекти на гелданамицин (А) и на гелданамицин в комбинация с NU7026 (Б) върху репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в ДНК, анализирани с неутрален комет тест. Пробите бяха третирани с 0.1  $\mu\text{M}$  гелданамицин в продължение на 2 часа и с 10  $\mu\text{M}$  NU7026 за 30 мин, след което бяха облъчени с доза от 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ. Нивата на нерепарирани лезии в ДНК бяха определени 0, 10 и 60 мин след облъчването и сравнени с облъчените, но нетретирани с гелданамицин проби (А) и с тези, определени за облъчените и третирани с NU7026 проби (Б); \* $p \leq 0.001$ .

#### 4.2 Роля на протеазома в репарацията на радиационно-индуцирани повреди в ДНК.

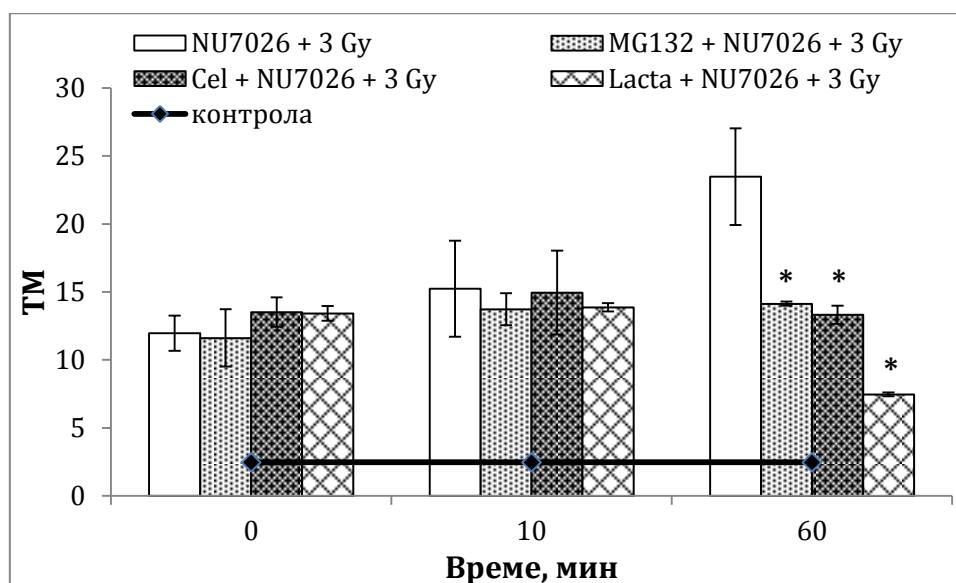
Протеазомът е протеолитичен ензимен комплекс, който отговаря за разграждането на важни сигнални молекули, тумор-супресори, регулатори на клетъчния цикъл, транскрипционни фактори, инхибиторни молекули и антиапоптични протеини, като по този начин изпълнява контролни и регулаторни функции в процеси като клетъчен цикъл, апоптоза, транскрипция и ДНК репарация. Ефектът върху клетъчния репаративен отговор на облъчените клетки беше проверен с помощта на три инхибитора: един синтетичен пептид (MG132) и два инхибитора с естествен произход – растителен (целастрол) или изолиран от актинометици (лактацистин). Целастролът и MG132 са обратими инхибитори на протеазомния комплекс, докато лактацистинът се свързва и блокира протеазома необратимо.

Както е отразено на фигура 2, третирането на клетките и с трите инхибитора на протеазома ускорява репарацията на радиационно-индуцираните двойноверижни повреди в облъчените мононуклеарни клетки. По-значими ефекти бяха наблюдавани 60 мин след облъчването, като в третираните с MG132 и zcelaстрол клетки се достигнаха контролните нива.



**Фигура 2.** Ефекти на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин върху репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в ДНК, анализирани с неутрален комет тест. Пробите бяха третирани с 0.1  $\mu$ M MG132, с 0.1  $\mu$ M целастрол или с 1  $\mu$ M лактацистин в продължение на 2 часа, след което бяха облъчени с доза от 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ. Нивата на нерепарираните лезии в ДНК бяха определени 0, 10 и 60 мин след облъчването и сравнени с тези, определени за облъчените, но нетретирани със съответните протеазомни инхибитори проби; \* $p \leq 0.001$ .

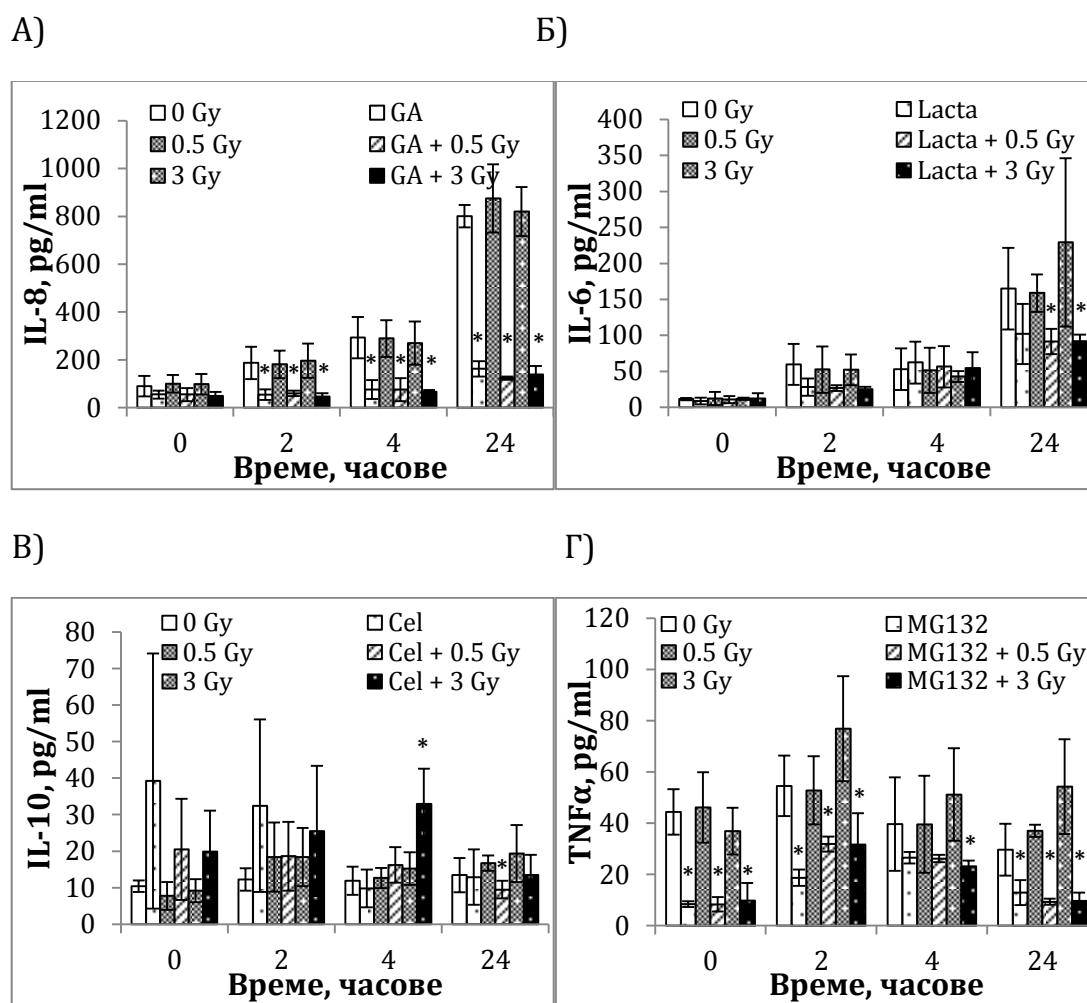
Като се има предвид ролята на DNA-PK<sub>CS</sub> в репарацията на радиационно-индуцирани DSB, както и ролята на комплекса DNA-PK, съставен от протеините Ku и DNA-PK<sub>CS</sub>, който може да блокира и да предпази повредените краища от разграждане, изследвахме дали DNA-PK<sub>CS</sub> има принос за протективното въздействие на изследваните протеазомни инхибитори. За целта беше анализирана кинетиката на ДНК репарация в клетки със специфично инхибирана каталитична активност на DNA-PK<sub>CS</sub>. Както е показано на фигура 3, в началото на репаративния процес (0<sup>ва</sup> и 10<sup>та</sup> мин), нивата на нерепарираните повреди, измерени в пробите с инхибирана DNA-PK<sub>CS</sub>, предварително третирани с MG132, целастрол или лактацистин бяха близки до тези в клетките, нетретирани с изброените по-горе протеазомни инхибитори. Статистически достоверни разлики в нивата на повредите бяха установени 60 мин след облъчване на клетките, които се запазиха близки до първоначалните. Липсваше и допълнителна фрагментация на ДНК в клетките с инхибирана DNA-PK<sub>CS</sub>, третирани с MG132, целастрол или лактацистин, за разлика от тези с инхибирана киназа. Най-съществена репарация беше наблюдавана в пробата, третирана с лактацистин и с NU7026, 60 мин след облъчването.



**Фигура 3.** Ефекти на MG132, целастрол и лактацистин в комбинация с NU7026 върху репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в ДНК, анализирани с неутрален комет тест. Пробите бяха третирани с 0.1  $\mu$ M MG132, с 0.1  $\mu$ M целастрол или с 1  $\mu$ M лактацистин в продължение на 2 часа и с 10  $\mu$ M NU7026 30 мин преди облъчването, след което бяха облъчени с доза от 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ. Нивата на нерепарираните лезии в ДНК бяха определени на 0, 10 и 60 мин след облъчването и сравнени с тези, определени за облъчените и третирани с NU7026; \* $p \leq 0.001$ .

#### 4.3 Радиационно-индуциран възпалителен отговор, ефекти на инхибитори на молекулярния шаперон Hsp90 и на протеазома върху секрецията на цитокини след *in vitro* облъчване на клетките.

ЙЛ, в зависимост от дозата на облъчване и нейната мощност, могат да предизвикат както провъзпалителни, така и антивъзпалителни ефекти в облъчените клетки. В настоящото изследване бяха анализирани нивата на секреция на три провъзпалителни цитокина – IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  и на един антивъзпалителен цитокин – IL-10, след облъчване на клетките с 0.5 Gy или 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ. За да охарактеризираме въздействието на инхибиторите на Hsp90 и на протеазома върху възпалителния клетъчен отговор, мононуклеарните клетки бяха третирани с тях, облъчени и секрецията на изброените по-горе цитокини беше анализирана количествено. На фигура 4 са показани ефектите на гелданамицин (А), лактацистин (Б), целастрол (В) и MG132 (Г). За съответния цитокин е избран да бъде представен този модификатор, който е оказал най-съществен ефект.



**Фигура 4.** Ефекти на гелданамицин (А), лактацистин (Б), целастрол (В) и MG132 (Г) върху секреторните нива на IL-8, IL-6, IL-10 и TNFα. Пробите бяха третирани с 0.1 μM гелданамицин, 1 μM лактацистин, 0.1 μM целастрол или 0.1 μM MG132 в продължение на 2 часа, след което бяха облъчени с дози от 0.5 или 3 Gy и секрецията на цитокините беше определена на 4 времеви интервала – 0, 2, 4 и 24 часа след облъчването. Нивата на отделните цитокини бяха сравнени с тези, секретирани от РВМСs, които не са третирани със съответния инхибитор за изследвания времеви интервал; \* $p < 0.05$ .

От фигура 4А се вижда, че GA понижава съществено секрецията на IL-8, като значими разлики между пробите третирани с гелданамицин, независимо дали след това бяха подложени на облъчване и независимо от дозата на облъчване, бяха установени още на 2-рия час. При сравнение на данните за контролната проба, която не беше облъчена (0 Gy) и пробата третирана с GA, както и между облъчените проби (0.5 Gy и 3 Gy) и тези, предварително третирани с GA и облъчени с една от двете дози, бяха наблюдавани статистически достоверни разлики  $p < 0.05$  за 2-рия и 4-тия час, и  $p \leq 0.001$  на 24-тия час.

Подобни ефекти GA показва и при изследване на кинетиката на секреция на IL-6 (данните не са показани). Два часа след облъчването беше наблюдавано съществено понижение в секрецията на IL-6 в пробата третирана с GA и след това облъчена с 3 Gy в сравнение с тази, която не съдържаеше GA, а беше

подложена само на радиационно въздействие с 3 Gy ( $p=0.020$ ). Не бяха открити достоверни различия на същия час между пробата третирана с GA и тази, която първо беше третирана с GA, а след това облъчена с по-ниската доза от 0.5 Gy ( $p=0.114$ ), както и между контролната проба (0 Gy) и пробата третирана само с GA ( $p=0.052$ ). Същата тенденция се запази и на 4-тия час, като отново достоверна разлика се наблюдаваше само между пробата облъчена с 3 Gy и тази, комбинирано третирана с GA и 3 Gy ( $p=0.006$ ). 24 часа след началото на експеримента, статистическо значимо понижение в нивата на IL-6 беше регистрирано при всички проби, третирани с GA, без значение дали след това са облъчени или не. От получените резултати може да се заключи, че комбинацията от GA и 3 Gy показва най-силен инхибиторен ефект върху секрецията на IL-6 като статистически значими разлики се регистрираха още на 2-рия час след облъчването на клетките, което характеризира ранния радиационен отговор като дозово-зависим.

Ефектите на GA и облъчването върху кинетиката на секреция на антивъзпалителния цитокин IL-10, потвърдиха установения по-горе инхибиторен ефект на GA (данните не са показани). Той беше най-ясно изразен 24 часа след облъчването, когато се наблюдаваха статистически достоверни разлики между контролната проба и пробата третирана с GA ( $p=0.042$ ), между пробата облъчена с 0.5 Gy и тази, предварително третирана с GA и облъчена с 0.5 Gy ( $p=0.002$ ) и между пробата, подложена на 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ и комбинирано третираната проба с GA и 3 Gy ( $p=0.034$ ). При пробите подложени на радиационно въздействие с 0.5 или 3 Gy, статистически значим инхибиторен ефект на GA беше регистриран още на 4-тия час. Не беше открита статистическа значима разлика на 4-тия час между контролната проба (0 Gy) и пробата третирана с GA. Може да се направи извода, че допълнителното облъчване ускорява инхибиторния ефект на GA като потиска секрецията на антивъзпалителния цитокин IL-10 на 4-тия час след облъчването, но ефект от дозата не беше регистриран.

Секрецията на цитокина TNF $\alpha$  (данните не са показани) също беше повлияна в пробите третирани с GA, като най-значима разлика отново беше установена 24 часа след облъчване на клетките. При сравнение на 24-тия час между контролната проба, която не е подложена на радиационно въздействие (0 Gy) и пробата третирана с GA, както и между облъчените проби (0.5 Gy и 3 Gy) и между комбинацията от предварително третиране с GA и последващо облъчване с една от двете дози, на всички изследвани времеви интервала се наблюдаваха статистически достоверни разлики ( $p<0.05$ ). Единствено дозата от 3 Gy показва по-ранен, инхибиращ ефект върху секрецията на TNF $\alpha$  регистриран още на 2-рия час след облъчването на третирани с GA клетки ( $p=0.004$ ), което, подобно на IL-6, също може да бъде свързано с дозов ефект, характеризиращ ранния радиационен отговор.

В заключение може да се обобщи, че инхибирането на Hsp90 с гелданамицин значително потиска секрецията на всички изследвани цитокини. Облъчването на пробите с по-високата доза от 3 Gy в комбинация с GA може допълнително да редуцира секрецията на IL-6 и TNF $\alpha$  като част от ранния клетъчен отговор, регистриран 2 или 4 часа след облъчването.

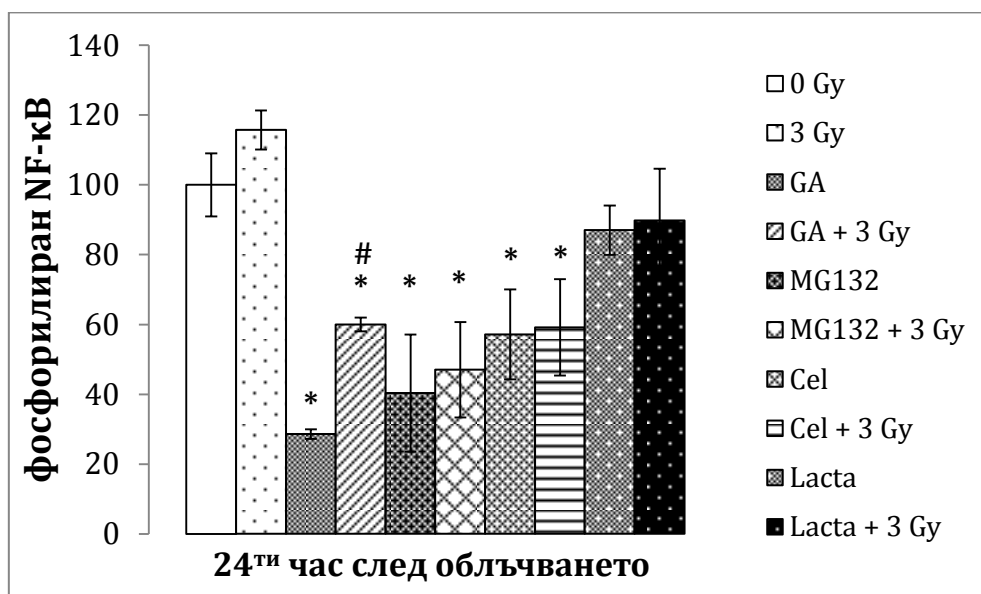
Изследвани са ефектите на естествения продукт лактацистин в ролята му на необратим инхибитор на протеазома върху секрецията на панела от цитокини. На фигура 4Б са представени ефектите върху провъзпалителния IL-6. Както се вижда от фигурата, на 2-рия и на 24-тия час са измерени по-ниски нива на IL-6 от клетките, предварително третирани с лактацистин. На 24-тия час са регистрирани достоверно по-ниски нива на IL-6, секретирани от клетки, които освен че предварително са третирани с лактацистин, са и облъчени с дози от 0.5 (p=0.020) или 3 Gy (p=0.016) в сравнение с третираните с инхибитора, но необлъчени клетки. Лактацистинът, както и *in vitro* облъчването на клетките с 0.5 Gy или 3 Gy, не оказаха ефекти върху секрецията на цитокините IL-8, IL-10 и TNF $\alpha$  (данните не са показани).

Беше установено, че целестролът понижава достоверно секрецията на провъзпалителните цитокини IL-6 (p<0.05) и IL-8 (p<0.05) на 24-тия час (данните не са показани), но също така в комбинация с 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ стимулира секрецията на антивъзпалителния IL-10 4 часа след облъчването (Фигура 4В). 24 часа след комбинираното въздействие с целестрол и облъчване с по-ниската доза от 0.5 Gy бяха наблюдавани достоверно по-ниски нива на IL-10 (p=0.018). Заслужава да се отбележи и фактът, че облъчването с 3 Gy допълнително стимулира действието на целестрола върху секрецията на IL-10 (p=0.008). На 4-тия час след облъчването бяха регистрирани най-високи нива на IL-10, секретирани от клетки, третирани с целестрол и облъчени с 3 Gy, които се различаваха достоверно от тези секретирани от облъчените с 0.5 Gy (p=0.022) или от необлъчените PVMCs (p=0.014). Стимулиращият ефект на целестрола върху секрецията на антивъзпалителния IL-10, регистриран в настоящето изследване, може да обясни антивъзпалителните свойства на целестрола, на базата на които е и неговото широко приложение в традиционната китайска медицина като антивъзпалителен агент за лечение на ревматоиден артрит, бактериални инфекции и треска (Westerheide et al., 2004).

Ефектите на синтетичния пептид MG132, обратим инхибитор на протеазома, върху възпалителния отговор бяха изследвани по нивата на секретираните цитокини TNF $\alpha$  (Фигура 4Г) IL-6, IL-8 и IL-10 (данните не са показани), продуцирани от моноклеарни клетки, облъчени с 0.5 или 3 Gy. MG132 потиска и силно понижава секрецията на всички изследвани цитокини, като облъчването на пробите не оказва съществено влияние върху инхибиторния ефект на MG132. Най-бърз инхибиторен ефект на MG132 беше установен върху секреторните нива на TNF $\alpha$  (Фигура 4Г), който беше регистриран веднага след облъчването (0 час). Достоверно се различаваха пробите, третирани предварително с MG132, а след това облъчени с 0.5 Gy (p=0.036) или 3 Gy (p=0.015), от тези, подложени само на радиационно въздействие със съответната доза. Разликата беше значима и между пробата, третирана само с MG132 и контролната проба (p=0.002). Ранен ефект на MG132 непосредствено след облъчването, се наблюдаваше и при цитокина IL-6 (данните не са показани). За разлика от TNF $\alpha$ , достоверни различия имаше само между пробата, предварително третирана с протеазомния инхибитор, а след това облъчена с по-високата доза от 3 Gy в сравнение с пробата, подложена само на радиационно въздействие със същата доза (p=0.046). Може да се обобщи, че протеазомният инхибитор MG132 показва значимо потисната секреция на всички

изследвани цитокини на 24-тия час ( $p < 0.05$ ) независимо от наличието или отсъствието на последващо облъчване и независимо от дозата на облъчване. За разлика от ефектите на другите модификатори, ефектите на MG132 върху секрецията на IL-6 и TNF $\alpha$  бяха значими и в по-ранните часове след облъчването.

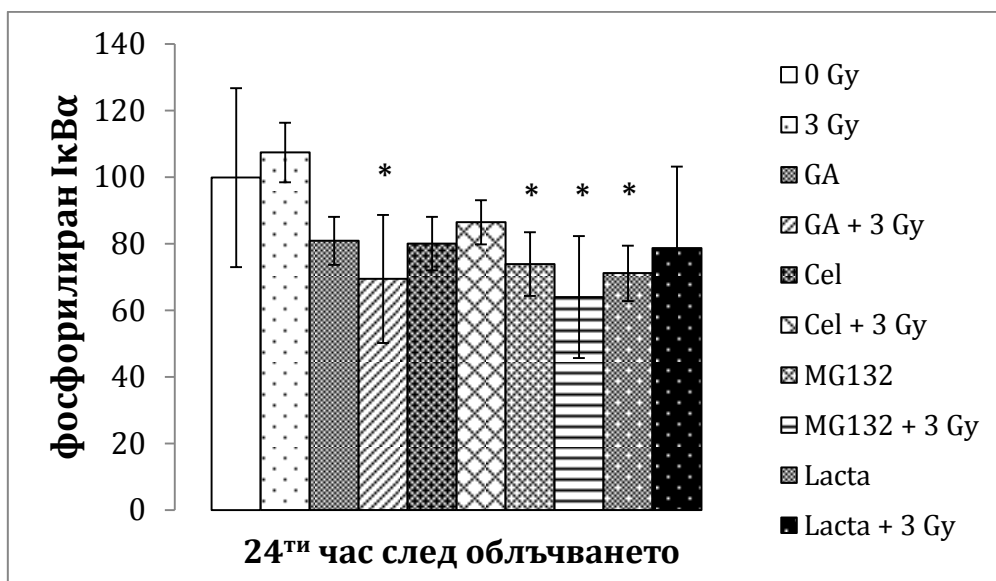
#### 4.4 Ефекти на молекуления шаперон Hsp90 и на протеазома върху количеството и активността на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B и върху активността на киназата I $\kappa$ B $\alpha$ в облъчени мононуклеарни кръвни клетки.



**Фигура 5.** Ефекти на инхибитора на молекуления шаперон Hsp90, гелданамицин и на протеазомните инхибитори MG132, целастрол и лактацистин върху нивата на фосфорилиран NF- $\kappa$ B по Ser536, измерени на 24-тия час в клетъчни лизати от човешки периферни мононуклеарни клетки, представени в % и отнесени към нетретирана и необлъчвана контрола (0 Gy). Пробите бяха третирани с 0.1  $\mu$ M GA, 0.1  $\mu$ M MG132, 0.1  $\mu$ M Cel или 1  $\mu$ M Lacta в продължение на 2 часа, които бяха приложени самостоятелно или в комбинация с 3 Gy гама-ЙЛ; \* $p < 0.05$  спрямо необлъчената контролна проба (0 Gy); # $p \leq 0.001$  при сравнение на пробата третирана с гелданамицин с тази, която освен третирана с гелданамицин, беше и облъчвана с 3 Gy.

След като не бяха открити разлики в протеиновите нива на тоталното количество NF- $\kappa$ B в клетки, третирани с различни инхибитори и облъчени с 3 Gy, беше измерена активната му форма (по Ser 536). Клетките, които бяха облъчени с 3 Gy  $\gamma$ -ЙЛ не показаха достоверна промяна в активността на NF- $\kappa$ B, в сравнение с необлъчвана и нетретирана контрола ( $p = 0.058$ ). Клетките, които бяха предварително третирани с инхибитора на Hsp90, гелданамицин ( $p = 0.002$ ) или с протеазомните инхибитори MG132 ( $p = 0.012$ ) или целастрол ( $p = 0.020$ )

показаха статистически значимо понижение в активността на NF-κB спрямо нетретирана и необлъчвана контрола. Същите модификатори, GA ( $p=0.001$ ), MG132 ( $p=0.012$ ) и целастрол ( $p=0.012$ ), в комбинация с последващо облъчване, отново показаха достоверни разлики с необлъчената и невъздействана контролна проба (Фигура 5). Дозова зависимост на инхибиторния ефект върху активността на NF-κB, беше установена единствено под въздействието на гелданамицин ( $p \leq 0.001$ ). Блокирането на шаперона Hsp90 в комбинация с облъчване с 3 Gy γ-лъчи значимо повишиха активността на NF-κB, сравнена с тази, измерена в пробите, които бяха инкубирани с гелданамицин но не бяха облъчени, резултат, показващ дозов ефект на инхибитора.



**Фигура 6.** Ефекти на гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин върху фосфорилираните нива на киназата IκBα по Ser32 и Ser36, измерени на 24-тия час в клетъчни лизати от човешки периферни мононуклеарни клетки, представени в % и отнесени към нетретирана и необлъчвана контрола (0 Gy). Пробите бяха третирани с 0.1 μM GA, 0.1 μM MG132, 0.1 μM Cel или 1 μM Lacta в продължение на 2 часа, които бяха приложени самостоятелно или в комбинация с 3 Gy гама-ЙЛ; \* $p < 0.05$  спрямо облъчената, нетретирана с инхибитори проба (3 Gy).

На фигура 6 са представени фосфорилираните нива на киназата IκBα по Ser 32 и Ser 36. Беше установено, че клетките, които бяха подложени на облъчване с 3 Gy γ-ЙЛ не показаха достоверна промяна в активността на киназата, в сравнение с необлъчвана и нетретирана контрола ( $p=0.813$ ). Клетките, които бяха предварително третирани с гелданамицин, MG132, целастрол или лактацистин, независимо от това дали след третирането бяха *in vitro* облъчени или не, също не показаха статистически значими разлики в активността на IκBα спрямо необлъчената контрола. Активността на IκBα обаче беше достоверно пониска от тази, измерена в облъчената проба, в пробите, третирани с протеазомните инхибитори MG132 ( $p=0.036$ ) и лактацистин ( $p=0.010$ ), без последващо *in vitro* облъчване, както и в пробите, предварително третирани с



гелданамицин ( $p=0.017$ ) или MG132 ( $p=0.002$ ) и подложени на последващо радиационно въздействие (Фигура 6).

#### 4.5 Значение на мутацията -94 ins/del AТТG в промоторния регион на NF-κB1 гена и връзка с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания.

rs28362491, известен още като -94 инсерция/делеция на четирите бази АТТG е полиморфизъм в промоторния регион на NF-κB1 гена. С АТТG<sub>1</sub> ще бъде означена делецията, а с АТТG<sub>2</sub> – инсерцията на съответната последователност от четири нуклеотида. Следователно възможните генотипове са: АТТG<sub>2</sub>/АТТG<sub>2</sub> (див тип; норма); АТТG<sub>2</sub>/АТТG<sub>1</sub> (хетерозигот); АТТG<sub>1</sub>/АТТG<sub>1</sub> (хомозигот, носител на мутацията и в двата алела). За анализа за полиморфизма бяха изследвани 69 човека – 24 външни контроли и 45 работници от АЕЦ „Козлодуй“. Групата работници в АЕЦ „Козлодуй“ включваше 44 мъже и една жена на възраст между 29 и 58 години. Външната контролна група се състоеше от 21 мъже и 3 жени на възраст между 35 и 57 години, които като социален статус и образование отговаряха на групата на работници от АЕЦ „Козлодуй“.

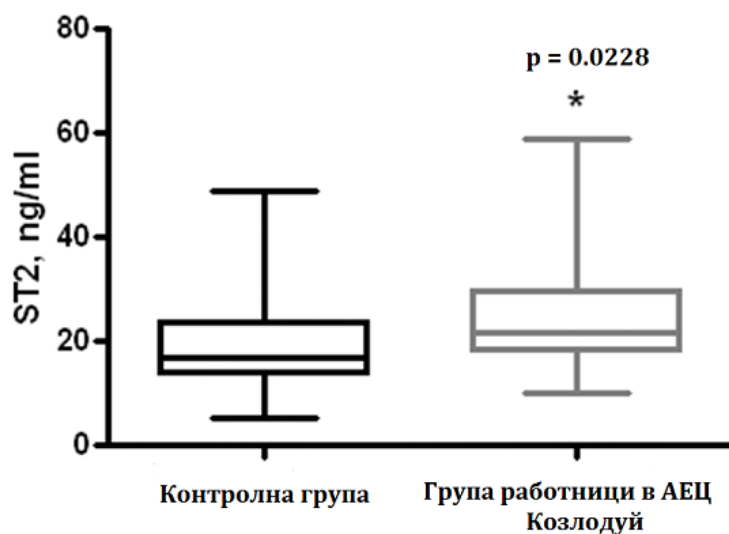
След определяне на генетичните профили на всички изследвани лица, беше установено, че 4 лица (17 %) от контролната група не носят мутацията в нито един от двата алела; 16 лица (66 %) са хетерозиготни носители на мутацията и 4 лица (17 %) са хомозиготни носители на делецията. От изследваната група на работници в АЕЦ „Козлодуй“ бяха определени 16 човека (36 %) хомозиготи от див тип; 21 човека (46 %) хетерозиготни носители и 8 човека (18 %) хомозиготи, носители на мутацията. В общата група най-голям процент са лицата с генотип АТТG<sub>2</sub>/АТТG<sub>1</sub> или хетерозиготите (54 %) или общо 37 човека. Лицата, носители на инсерцията с генотип АТТG<sub>2</sub>/АТТG<sub>2</sub> съставляват 29 % от общата група или общо 20 човека, а лицата, носители на делецията с генотип АТТG<sub>1</sub>/АТТG<sub>1</sub> са 17 % - 12 от всички изследвани 69 човека (Таблица 1).

**Таблица 1.** Генетичен профил на лицата в двете изследвани групи, представен като брой хора (*n*) и като процент (%) от съответната група.

Генетичен профил	Контролна група,	Работници в АЕЦ „Козлодуй“,	Общо,
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
АТТG <sub>2</sub> /АТТG <sub>2</sub>	4 (17)	16 (36)	20 (29)
АТТG <sub>2</sub> /АТТG <sub>1</sub>	16 (66)	21 (46)	37 (54)
АТТG <sub>1</sub> /АТТG <sub>1</sub>	4 (17)	8 (18)	12 (17)

За да бъде проучена връзката между генетичния профил на изследваните лица и риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване, бяха измерени нивата на разтворимата фракция на протеина ST2 (sST2) в кръвна плазма. За да се оцени възможността sST2 да се използва като биомаркер в епидемиологични проучвания, свързани с радиационно-индуцирани сърдечно-съдови проблеми, причинени от ниски дози ЙЛ, беше направено сравнение на нивата на протеина в контролната група и в групата на работниците от АЕЦ „Козлодуй“. Референтната граница при клинични изследвания на sST2 в плазма е до 35 ng/ml. Най-високата измерена стойност е в групата на работниците от АЕЦ „Козлодуй“ и е 58.82 ng/ml, което е 1.7 пъти повече от горната референтна граница. От общо 69 изследвани лица, в 10 бяха установени повишени нива на протеина – 9 (20 %) от тях бяха работещи в АЕЦ „Козлодуй“ и 1 (4 %) от контролната група. Това означава, че броя на лицата в експонираната група с повишени нива на сърдечния биомаркер sST2 е пет пъти по-голям, в сравнение с контролните лица.

При сравнение между двете групи чрез непараметричния метод ANOVA on Ranks, беше установена статистически достоверна разлика в измерените стойности на маркера за двете изследвани групи (Фигура 7,  $p=0.0228$ ). Получените резултати показват, че хроничното облъчване с ниски дози от предимно  $\gamma$ -ЙЛ на работници от АЕЦ „Козлодуй“, може да бъде асоциирано с повишен риск от развитие на сърдечно-съдови заболявания.



**Фигура 7.** Сравнение на стойностите на протеина sST2, измерени за лицата от контролната група ( $n=24$ ) и от групата на работниците от АЕЦ „Козлодуй“ ( $n=45$ );  $p=0.0228$ .

По литературни данни, мутацията -94 инсерция/делеция ATTG в NF- $\kappa$ B гена, също се асоциира с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания. В изследваната контролна група от 24 човека, лицето, при което бяха установени

нива на протеина sST2 над референтната граница е с генотип АТТG<sub>1</sub>/АТТG<sub>1</sub>, носител на мутацията в NF-κB1 гена. В групата на работниците от АЕЦ „Козлодуй“ нито едно лице с повишени стойности на sST2 над 35 ng/ml не притежава генотипа, носител на мутацията и в двата алела. Трима от работниците, при които е повишен sST2 са хетерозиготи с генотип АТТG<sub>2</sub>/АТТG<sub>1</sub>, а останалите шест, не са носители на делецията (генотип АТТG<sub>2</sub>/АТТG<sub>2</sub>).

## 5 ДИСКУСИЯ

### 5.1 Инхибитори на молекуления шаперон Hsp90 и на протеазома са ефективни модификатори на репаративния клетъчен отговор.

Двойноверижните повреди, предизвикани от облъчване на клетките, се считат за „специфичен почерк“ на ЙЛ. Те се дефинират като по-сложна, клъстерна повреда, която ако не бъде поправена, може да доведе до възникването на хромозомни аберации, програмирана клетъчна смърт или други съдбовни за клетката събития (Shikazono et al., 2009), поради което всички фактори, които могат да окажат влияние върху репарацията на тези лезии, са от съществено значение за радиационния отговор. В настоящия дисертационен труд като такива фактори бяха изследвани инхибиторът на молекуления шаперон Hsp90, гелданамицин и протеазомните инхибитори целастрол, MG132 и лактацистин. Ефектите на тези съединения върху кинетиката на репарация на двойноверижни повреди в ДНК на нормални клетки от периферна кръв бяха анализирани след облъчване с клинично релевантната доза при фракционирано облъчване от 3 Gy  $\gamma$ -лъчи. За целта бяха анализирани промените в нивата на нерепарираните двойноверижни лезии, които бяха определяни непосредствено след облъчването, 10 мин и 60 мин след радиационното въздействие. Това позволи анализ на въздействието на инхибиторите върху различните фази на репарацията – бърза, до 10 мин след облъчването и бавна фаза, до около 60 мин след радиационното въздействие.

Шаперонът Hsp90 освен че активно участва в „контрола на качеството на огромен брой протеини“ и регулира протеома, е известен и като „онкошаперон“ по две основни причини: 1. Експресията на Hsp90 е от два до десет пъти по-висока в туморните, в сравнение с нормалните клетки и 2. Hsp90 е отговорен за физиологичната активност на огромен брой онкопротеини и представлява атрактивна терапевтична мишена при лечението на ракови заболявания. Инхибирането на Hsp90 може да индуцира разграждане на голям брой онкопротеини, които са негови субстрати и по този начин да съдейства за унищожаване на тумора. Поради това се счита, че инхибиторите на Hsp90 могат да бъдат прилагани успешно самостоятелно или в комбинация с други химиотерапевтици и/или лъчелечение при терапия на ракови заболявания (Kabakov et al., 2010). Третирането на клетки с GA блокира шаперонната функция на Hsp90 и неговите хомолози, като молекуления шаперон Grp94 (глюкозо-регулиран протеин 94) от ендоплазмения ретикулум, което води до конформационна дестабилизация на множество цитозолни протеини. Натрупването на такива неактивни протеини в лумена на ендоплазмения ретикулум иницира серия от пътища на сигналната трансдукция и индуцира стресов отговор – UPR (Unfolded Protein Response), насочен към оцеляване на клетката в стресови условия (Yamamori et al., 2013). Йонизиращите лъчения, освен геномната ДНК и мембраните, могат също да увредят и дестабилизируют редица протеини и ензими и да причинят натрупване на неактивни протеини, които не могат да изпълняват физиологичните си функции в клетката. Тези процеси като част от радиационния отговор, могат да мобилизират клетките и

да повишат техния протективен капацитет и радиорезистентност. Има изследвания, които показват, че 17-DMAG (17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin), аналог на GA, може да предпази човешки Т-клетки и нормални РВМС от гама лъчение и да предотврати апоптоза в облъчени клетки (Fukumoto and Kiang, 2011, Kiang et al., 2009). Протективният ефект на 17-DMAG е свързан с инхибиране на азотен оксид синтаза (iNOS) и на p53, като и двата протеина принадлежат към субстратите на Hsp90. Доклад от същата лаборатория охарактеризира 17-DMAG като потенциален радиопротектор за клетки на костния мозък и тънките черва при мишки (Lu et al., 2013).

Нашите резултати показаха, че клетките, които бяха предварително третирани с гелданамицин ускоряват кинетиката на репарация на радиационно-индуцираните двойноверижни повреди в ДНК и 10 мин след облъчването около половината от тези лезии бяха поправени, а 60 мин след радиационното въздействие, репарацията беше приключила напълно и нивата на двойноверижните повреди бяха достигнали контролните нива, определени в необлъчени и нетретирани с инхибитора клетки. Възможен механизъм, който може да обясни радиопротективния ефект на гелданамицина е свързан с нехомоложната репарация на радиационно-индуцирани двойноверижни лезии (NHEJ) и ролята на киназата DNA-PK<sub>CS</sub>, ключов ензим в този процес. DNA-PK<sub>CS</sub> принадлежи към субстратите на Hsp90 и образува стабилен комплекс с шаперона в цитоплазмата на клетката. Стимулиращ ефект на гелданамицина върху репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни лезии в ДНК беше регистриран и в присъствието на NU7026, инхибитор на DNA-PK<sub>CS</sub>. В клетките, в които 2 часа преди облъчването киназата DNA-PK<sub>CS</sub> е активирана от GA, репарация протича дори и в присъствието на NU7026, прибавен 30 мин преди облъчването на клетките. 10 мин след облъчването, в третираните с двата инхибитора клетки – гелданамицин и NU7026, са поправени около половината от радиационно-индуцираните двойноверижни повреди, които 1 час по-късно достигат контролните нива, измерени в необлъчените и нетретирани с инхибиторите клетки. Много вероятно е след дисоциация на комплекса между шаперона и киназата в присъствието на GA, киназата да променя конформацията и локализацията си от цитозола в ядрото, което да затруднява взаимодействията ѝ с NU7026 и да ѝ позволява да участва в репаративния процес (Фигура 8). В заключение, нашите експериментални данни потвърждават, че гелданамицинът в качеството си на протектор, ефективно стимулира репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни лезии в ДНК и може да бъде считан за модификатор на радиационния клетъчен отговор.

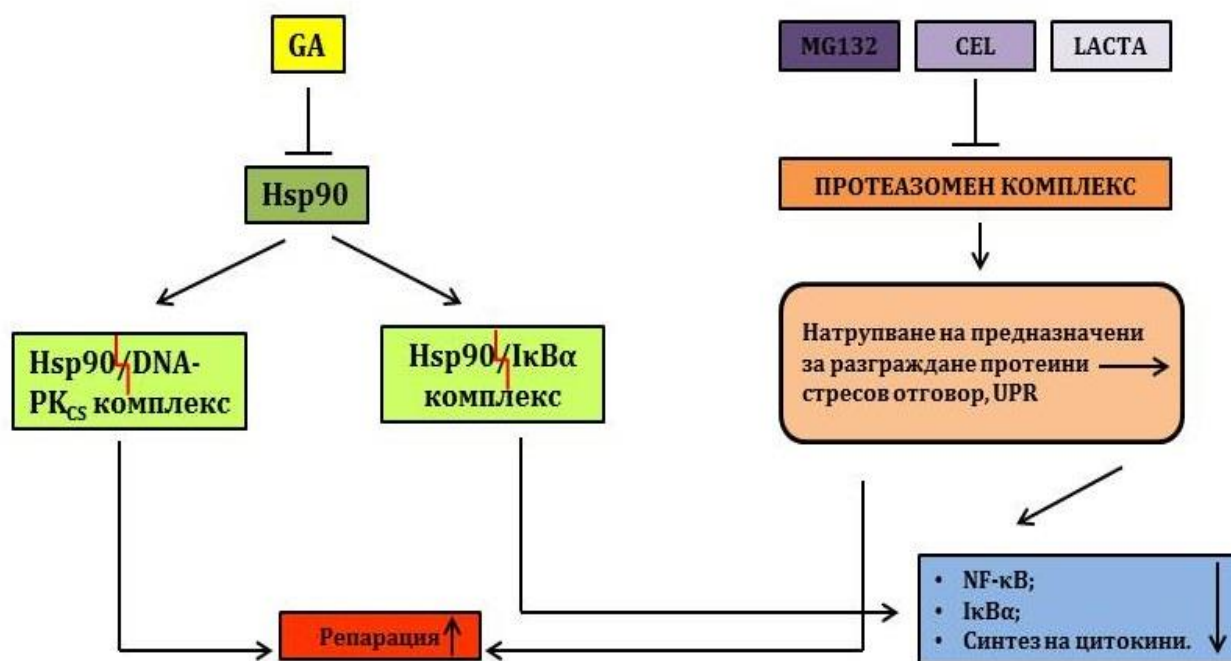
Промени в репаративния отговор бяха изследвани и след блокиране на протеазома с различни по произход и действие протеазомни инхибитори. Протеазомът е мултикаталитичен комплекс от протеази, отговорни за разграждане на важни вътреклетъчни протеини и ензими, които участват в основни клетъчни събития, включващи репарация на ДНК, контрол на клетъчния цикъл, клетъчната преживяемост и апоптоза (Adams, 2003). Инхибирането на протеазома е придружено от натрупване в клетките на предназначени за разграждане протеини, включително ключови ензими, участващи в ДНК репарацията (Walcott and Heikkila, 2010). Това може да

индуцира UPR и първоначален стрес, който да подготви клетките за последващото въздействие с ЙЛ и да модифицира клетъчния отговор.

В този дисертационен труд беше анализирано влиянието на три инхибитори на протеазома – целастрол, MG132 и лактацистин с различен произход – естествен или синтетичен и различен механизъм на действие – обратимо и необратимо инхибиране на протеазомния комплекс. Беше установено, че предварителното третиране на клетките и с трите инхибитора ускорява репарацията на радиационно-индуцираните двойноверижни повреди в облъчените моноклеарни клетки. В бързата фаза на репарацията, 10 мин след облъчването на клетките с 3 Gy  $\gamma$ -лъчи, репаративната кинетика в пробите, предварително третирани с някой от трите изследвани инхибитора не се различаваше от тази, която показаха клетките, подложени само на радиационно въздействие. Значими ефекти върху кинетиката на ДНК репарация и стимулиране на репаративните процеси бяха наблюдавани в по-късната фаза, между 10-тата и 60-тата минути след облъчването, като репарацията беше напълно завършена в третирани с MG132 и целастрол клетки 60 мин след облъчването. Като се вземе предвид, че в бързата фаза на репарацията се поправят по-прости лезии, а бавната фаза е свързана с репарация на по-сложни, клъстерни повреди, може да се направи извода, че протеазомните инхибитори стимулират репарацията на клъстерни радиационно-индуцирани повреди в ДНК. Единствено в пробите, които преди облъчването бяха третирани с лактацистин, 60 мин след радиационното въздействие, контролните нива не бяха достигнати, независимо от това, че измерените нива на остатъчните радиационно-индуцирани повреди бяха достоверно по-ниски от тези, в пробите, които не бяха третирани с инхибитора. Вероятно обяснение на този експериментален резултат би могло да бъде свързано отново със стресовия отговор, UPR, като важен вътреклетъчен сигнален път, индуциран след инхибиране на протеазома. В клетката освен, че се натрупват редица репаративни ензими и протеини, които все още са функционално активни и участват в репарацията, се увеличава и количеството на АФК, което води до дисбаланс в нивата на АФК и на клетъчната защитна система. Наличието на слаб оксидантен стрес, следствие от протеазомното инхибиране, би могло да играе ролята на адаптивен фактор за клетката към последващото въздействие с ЙЛ.

Промените в кинетиката на репарация и протективното действие на протеазомните инхибитори в присъствието на NU7026, инхибитор на DNA-PK<sub>CS</sub>, могат да бъдат обяснени като се вземе предвид ролята на комплекса DNA-PK, съставен от киназата DNA-PK<sub>CS</sub> и протеините Ku70 и Ku80, който блокира и предпазва повредените краища от разграждане в репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в ДНК на кръвните клетки. Протеините Ku70 и Ku80 разпознават и се свързват много бързо с крайщата на ДНК при повредата, след което свързват DNA-PK<sub>CS</sub> и образуват комплекса DNA-PK, който блокира и предпазва крайщата от протеолитично разграждане. Показано е, че Ku70 и Ku80 се разграждат от протеазома (Gama et al., 2006). Следователно, протеазомните инхибитори, блокирайки протеазома, могат да блокират протеолитичното разграждане на Ku и по този начин да окажат влияние върху репарацията на DSB (Фигура 8). Конкретно в изследвания от нас случай, може да се предположи, че след инхибирането на протеазома, комплексът DNA-PK остава

свързан с ДНК краищата при повредата, което блокира както репарацията на лезиите, така и разграждането на повредената от облъчването ДНК. В предварителното третиране с протеазомните инхибитори целастрол и MG132 проби, последвано от допълнително въздействие с NU7026, инхибитор на DNA-PK<sub>CS</sub>, нивата на радиационно-индуцираните повреди в ДНК, се запазват едни и същи за времето от един час след облъчването. Единствено при комбинираното третиране с лактацистин и NU7026, 60 мин след радиационното въздействие се наблюдаваше достоверно понижение в нивата на възникналите DSB. Лактацистинът като необратим инхибитор, блокира по-ефективно протеолитичната активност на протеазомния комплекс, за разлика от останалите два изследвани инхибитори. В присъствие на лактацистин вероятно се натрупват по-голям брой неразградени, но все още функционално активни репаративни ензими, които успяват да поправят възникналите лезии и това обяснява наблюдаваната по-висока ефективност на този инхибитор.



**Фигура 8.** Схематично представяне на ефектите на изследваните инхибитори върху репаративния и възпалителния отговор. Гелданамицинът, инхибитор на молекулния шаперон Hsp90, може да разруши комплекса на Hsp90 с киназата DNA-PK<sub>CS</sub>, ключов ензим от NHEJ, което ускорява репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни скъсвания, както и да дисоциира комплекса на Hsp90 с киназата IκBα. Това позволява на IκBα, да бъде протеолитично разградена, което инхибира NF-κB пътя и синтеза на възпалителни цитокини. Инхибирането на протеазома от MG132, целастрол или лактацистин, е придружено от натрупване в клетката на предназначени за разграждане репаративни протеини и ензими, което индуцира стресов отговор и ускорява репарацията. Инхибирането на протеазома не позволява разграждането на IκBα, а това потиска NF-κB-зависимата транскрипция и синтеза на цитокини и хемокини, което води до модифициране на възпалителния отговор.

## **5.2 Гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин са ефективни модификатори на възпалителния отговор като част от клетъчния отговор към радиационно въздействие.**

Установено е, че Hsp90 може да стимулира синтеза на провъзпалителни цитокини при автоимунни и хронични възпалителни заболявания (Tukaј and Wegryzn, 2016). Предклинични данни свързват инхибирането на Hsp90 с успешното лечение на хронични възпалителни заболявания като увеит (Poulaki et al., 2007), ревматоиден артрит (Rice et al., 2008), сепсис (Chatterjee et al., 2007) и атеросклероза (Madrigal-Matute et al., 2010). Показано е също така, че инхибирането и на протеазома представлява противовъзпалителна стратегия при възпалителни и автоимунни заболявания (Elliott et al., 2003). Така например заболявания като ревматоиден артрит, възпалителни заболявания на червата, множествена склероза и астма, често са свързани с активното участие на моноцитни клетки и с нарушената експресия и синтез на провъзпалителните цитокини и техните рецептори (Garton et al., 2006, Liu and Malik, 2006). Следователно, както инхибирането на молекулния шаперон Hsp90, така и инхибирането на протеазомния комплекс, представляват механизъм за регулиране на възпалителните цитокини и техните рецептори. Инхибиторите на Hsp90 и на протеазома могат да окажат влияние и върху важни транскрипционни фактори, между които са NF-κB и AP-1, които участват в патофизиологията на тези заболявания. За да изследваме ефектите на тези инхибитори върху възпалителния отговор, в настоящия дисертационен труд бяха измерени екстрацелуларните нива на изследвания от нас панел цитокини – провъзпалителните IL-6, IL-8 и TNFα и антивъзпалителния IL-10 след облъчване на мононуклеарните клетки с две дози гама лъчи – 0.5 и 3 Gy. Кинетиката на секреция на цитокините беше измерена веднага, 2, 4 и 24 часа след радиационното въздействие.

Инхибирането на шаперона Hsp90 с гелданамицин значително потисна секрецията на изследваните цитокини, независимо от това дали са про- или антивъзпалителни. Още на 2-рия час след облъчването се наблюдаваха значително по-ниски нива на синтез на IL-6 като тенденцията беше запазена 4 и 24 часа след облъчването. Секрецията на IL-8 от клетки, в които Hsp90 е инхибиран с гелданамицин, също беше редуцирана. Този резултат потвърждава изследване на група автори, в което те показват, че гелданамицинът инхибира TNFα-медираната генна експресия на IL-8 в A549 човешка белодробна аденокарциномна клетъчна линия, като потиска активирането на промотора на IL-8 (Malhotra et al., 2001). Гелданамицинът показва инхибиращ ефект също и върху секрецията на TNFα и на антивъзпалителния IL-10. В заключение може да се отбележи, че инхибирането на Hsp90 посредством гелданамицин модифицира възпалителния отговор и 24 часа след облъчването, независимо от дозата на облъчване, се наблюдаваше силно потисната секреция на всички изследвани цитокини. В ранните часове след облъчването, комбинираното въздействие на гелданамицин и 3 Gy понижи значително единствено нивата на IL-6 (4-ти час) и TNFα (2-ри час), което би могло да се охарактеризира като ранен дозово-зависим клетъчен отговор.



Протеазомният инхибитор MG132, подобно на гелданамицина, оказва инхибиторен ефект върху секрецията на цитокините и измерените им екстрацелуларни нива бяха значително понижени. За разлика от гелданамицина обаче, MG132 понижи секрецията на всички изследвани цитокини и в по-ранните часове след радиационното въздействие като значително по-ниски нива на IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  бяха измерени 2 часа след облъчването.

Протеазомният инхибитор целастрол за разлика от всички останали изследвани инхибитори, стимулираше секрецията на антивъзпалителния цитокин IL-10 и още на 4-тия час след облъчване на клетките с 3 Gy  $\gamma$ -лъчи, бяха регистрирани значително по-високи нива на IL-10. Този резултат ясно показва антивъзпалителните свойства на целастрола, на базата на които е и неговото широко приложение в традиционната китайска медицина като антивъзпалителен агент за лечение на ревматоиден артрит, бактериални инфекции и треска (Westerheide et al., 2004). Антивъзпалителният ефект на целастрола беше потвърден и от ефектите му върху секрецията на провъзпалителните цитокини IL-6 и IL-8; 24 часа след облъчването на клетките секрецията на тези два цитокина беше значително потисната и ефектът не беше дозово зависим.

Ефект на лактацистина като необратим инхибитор на протеазома върху възпалителния отговор беше регистриран само по промяна в нивата на IL-6, които бяха значително понижени 24 часа след облъчването. Лактацистинът не оказва ефект върху секрецията на останалите цитокини – IL-8, IL-10 и TNF $\alpha$ .

Наблюдаваните промени в секрецията на изследваните цитокини, индуцирани от инхибиторите гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин като модификатори на възпалителния отговор, бяха обяснени с промени в основния механизъм, по който цитокините се синтезират и който включва участието на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B. Нашите експериментални резултати показаха, че четирите изследвани инхибитора, приложени самостоятелно или в комбинация с последващо  $\gamma$ -лъчение (доза от 3 Gy), не оказват влияние върху тоталното клетъчно съдържание на транскрипционния фактор, измерено 24 часа след облъчването, но понижиха значително неговата активност. Активността на NF- $\kappa$ B беше силно редуцирана в пробите, предварително третирани с гелданамицин, MG132 и целастрол, независимо дали след това бяха необлъчени или облъчени с 3 Gy. Единствено лактацистинът не оказва влияние върху активността на транскрипционния фактор, резултат който потвърди регистрираното от нас отсъствие на ефекти на лактацистина върху секреторните нива на изследваните цитокини. Последната стъпка в този анализ беше проверка на индуцираните от инхибиторите промени в активността на киназата I $\kappa$ B $\alpha$ , негативен регулатор на NF- $\kappa$ B, с когото формират неактивен комплекс, локализиран в цитоплазмата на клетката. Нашите резултати показаха тенденция към намаляване на активността на I $\kappa$ B $\alpha$  след третиране и с четирите изследвани модификатора, приложени самостоятелно или в комбинация с облъчване, което обеснява потиснатия NF- $\kappa$ B-зависим път за синтез на цитокини и хемокини, а оттам и понижените нива на изследваните възпалителни цитокини.

Известно е, че NF- $\kappa$ B участва в регулацията на гени, които кодират цитокини и хемокини (Pahl, 1999) и се активира в отговор на различни сигнали,

включително цитокини, травми или други стресови условия. Освен това NF- $\kappa$ B може да функционира и съвместно с други транскрипционни фактори като AP-1 например, който от своя страна може да повиши синтеза на провъзпалителните цитокини (Khalaf et al., 2010). Известно е също така, че киназата I $\kappa$ B $\alpha$ , която е субстрат на шаперона Hsp90 и образува комплекс с него, регулира транскрипционната активност на NF- $\kappa$ B (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Гелданамицинът може да предизвика дисоциация на комплекса на I $\kappa$ B $\alpha$  с Hsp90, придружено от протеолитичното разграждане на I $\kappa$ B $\alpha$ , което води до потискане на NF- $\kappa$ B пътя и като следствие от това и до модифициране на възпалителния отговор. Инхибирането на протеазома не позволява разграждането на I $\kappa$ B киназите, а това от своя страна, както вече беше споменато по-горе, потиска NF- $\kappa$ B-зависимата транскрипция на гени за цитокини и хемокини, ефект, регистриран в това изследване (Фигура 8).

### **5.3 Връзка между полиморфизъм в NF $\kappa$ B1 гена, професионално излагане на ниски дози ЙЛ и повишен риск от развитие на сърдечно-съдово заболяване.**

В отговор на различни стимули, клетките секретират в кръвната плазма голям брой протеини, информативни за клетъчните процеси, които протичат и могат да се използват като биомаркери за диагностика, прогноза, оценка на риска или за проследяване на качеството на дадена терапия. Следователно, идентифицирането на достъпни, специфични и надеждни биомаркери е от важно значение за прогнозно въздействие на хронично излагане на вредни фактори, включително ЙЛ, върху здравето.

Показано е, че радиационното въздействие може да увеличи риска от смърт, като следствие от сърдечно заболяване; изчисленият риск е приблизително 17 % на Gy след целотелесно гама-облъчване (Baker et al., 2011, Little et al., 2010). Разтворимата фракция на протеина ST2 (sST2) е охарактеризирана като прогностичен клиничен биомаркер за сърдечна недостатъчност. Това ни мотивира да изследваме дали sST2 може да се използва като биомаркер в епидемиологични проучвания, свързани с мониторинг на риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване в резултат от професионално облъчване с ниски дози ЙЛ. Стойностите на sST2, измерени за двете изследвани групи – контролна (24 външни контроли) и облъчена (45 работници от АЕЦ „Козлодуй“) показаха, че в експонираната група броят на лицата с повишени стойности на sST2 е пет пъти по-висок в сравнение с контролната. Този резултат би могъл да бъде асоцииран с повишен риск от развитие на сърдечно-съдови заболявания в групата на професионално облъчените работници.

Известно е, че облъчването може да индуцира формиране на АФК и количеството им се увеличава с дозата, което може да повлияе върху сърдечно-съдовата функция. Малки количества от АФК лесно се обезвреждат от клетката, но техните необичайно високи нива могат да доведат до нарушение в баланса между оксидантната продукция и антиоксидантната защита, водейки до състояние на оксидантен стрес. Клинични проучвания са показали връзка между повишени нива на sST2 и възпалителния статус на хора (Rodriguez-Manas

et al., 2009). Този резултат идентифицира възпалителните процеси като възможен път, по който sST2 повишава риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване. IL-33 освен цитокин и транскрипционен фактор, изпълнява ролята на лиганд на ST2 и IL-33/ST2 сигнализацията е ключов кардиопротективен механизъм. Sanada и съавтори предоставят доказателства за ролята на АФК в IL-33/ST2 сигналните процеси в модели на мишки, показвайки че IL-33 може да предотврати или поне да намали сърдечните увреждания след понижаване на нивата на ангиотензин II, генерирани от АФК (Sanada et al., 2007).

Настоящият труд имаше за цел да провери дали съществува връзка между белтъка ST2 и транскрипционния фактор NF-κB. От съществено значение е дали мутация в гена на NF-κB може да се отрази върху здравето и физиологичното състояние на хората и дали това би увеличило риска от развитие на сърдечно-съдово заболяване в бъдеще. Ролята на NF-κB при сърдечна недостатъчност е изследвана от редица автори, но тя все още остава неизяснена (Valen et al., 2001). Показано е, че NF-κB е активен в клетката в две форми, известни като p105 и хомодимерът (p50)<sub>2</sub>. P105 формира комплекси с протеини, които не са част от NF-κB семейството, като по този начин осигурява връзка между NF-κB и други сигнални пътища, участващи в регулирането на редица клетъчни функции. За (p50)<sub>2</sub> се смята, че може да играе роля, както на активатор на транскрипцията, така и на супресор (Pereira and Oakley, 2008).

Изследваният от нас полиморфизъм, засягащ промоторния регион на NFκB1 гена, rs28362491, за първи път е описан от Karban и съавтори и е асоцииран с повишен риск от улцерозен (язвен) колит (Karbon et al., 2004). Няколко години по-късно е свързан и с повишен риск от разширена кардиомиопатия (Zhou et al., 2009). Друга група автори провеждат голямо изследване на същия полиморфизъм, в което изследват 493 пациенти със сърдечна недостатъчност и 916 лица от общата популация. Сравнени са алелните и генотипните честоти между групите. В заключение те обобщават, че няма генотипна или алелна връзка между изследвания полиморфизъм и развитието на сърдечна недостатъчност. Въпреки това генотипа на делецията (ATTG<sub>1</sub>/ATTG<sub>1</sub>) може да се свърже с намалена активност на NFκB1, което от своя страна може да има модулиращ ефект върху началото на болестта. След като индивидът има установена сърдечна недостатъчност, наличието на мутацията може да се асоциира и с промени в тежестта на заболяването (Santos et al., 2010).

В нашето изследване ние разгледахме ролята на полиморфизма, свързана с намалена транскрипция на NFκB1, поради делеция на четири базови двойки в промоторната област на гена, което води до невъзможност на свързване на ядрени протеини, в резултат на което се намалява промоторната активност. За целта на анализа бяха изследвани общо 69 човека – 24 контроли и 45 работници от АЕЦ „Козлодуй“, същите при които беше измерена разтворимата фракция на белтъка ST2. След определяне на генетичните профили на всички изследвани лица беше установено, че 4 лица от контролната група не носят мутацията в нито един от двата алела; 16 лица са хетерозиготни носители на мутацията и 4 лица са хомозиготни носители на делецията. От групата на работници в АЕЦ „Козлодуй“ бяха определени 16 лица хомозиготи от див тип; 21 лица хетерозиготни носители и 8 лица хомозиготи, носители на мутацията.

За първи път беше направена корелация между нивата на протеина sST2, мутацията в промоторния регион на NF-κB1 гена и професионалното облъчване. Не беше открита връзка между повишени нива на sST2 и мутантен генотип в групата на работниците от АЕЦ „Козлодуй“, но в контролната група, лицето при което бяха измерени стойности на sST2 над клиничния праг, беше носител на делецията. Основно ограничение в това молекулярно-епидемиологично изследване беше недостатъния брой изследвани лица и в двете групи – контролна и облъчена. Разширяването на кохортите е необходимо и задължително условие, за да се подобри статистическата сила на данните. Би било добре проучването да се превърне в проспективно и на хората с установен мутантен генотип да се проследява както сърдечния биомаркер sST2, така и други показатели, които биха могли да имат отношение към ранно диагностициране на евентуално сърдечно-съдово заболяване.

## ИЗВОДИ

1. Инхибиторът на молекулния шаперон Hsp90 гелданамицин и инхибиторите на протеазома MG132, целастрол и лактацистин могат да окажат радиопротективен ефект като стимулират репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди в ДНК молекулите на човешки мононуклеарни клетки.
2. Гелданамицинът активира киназата DNA-PKCS, ключов ензим от NHEJ, което стимулира репарацията на радиационно-индуцирани двойноверижни повреди.
3. Инхибиторите гелданамицин, MG132 и целастрол потискат секрецията на провъзпалителните цитокини IL-6, IL-8 и TNF $\alpha$  в човешки кръвни мононуклеарни клетки.
4. Протеазомният инхибитор целастрол може да стимулира секрецията на антивъзпалителния цитокин IL-10 като част от ранния радиационен отговор на облъчени мононуклеарни кръвни клетки.
5. Гелданамицинът, MG132 и целастролът понижават активността на транскрипционния фактор NF- $\kappa$ B в облъчени човешки клетки от периферна кръв.
6. Проведеното молекулярно-епидемиологично изследване показва, че професионалното облъчване с ниски дози ЙЛ повишава нивата на сърдечния биомаркер sST2 и риска от сърдечно-съдови заболявания.

# ПРИНОСИ

## Научни

- Изследвани са биологичните ефекти на гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин върху репаративния и възпалителния отговор на облъчени човешки мононуклеарни клетки от периферна кръв. Четирите съединения могат да модифицират радиационния отговор като активират механизми, които повишават резистентността на облъчените клетки, което ги характеризира като радиопротектори.
- Проведено е молекулярно-епидемиологично изследване за оценка на риска от сърдечно-съдови заболявания при професионално облъчени с ниски дози ЙЛ работници от АЕЦ „Козлодуй“ по нива на сърдечния биомаркер sST2 и мутация в промоторния регион на NFκB1 гена.

## Методични

- Въведен е високочувствителен имунохимичен метод (ELISA) за анализ на нивата на протеина sST2 в кръвна плазма, подходящ за скрининг и анализ на голям брой биологични проби.
- Въведен и оптимизиран е Real-Time PCR метод с последващ HRM анализ за определяне на полиморфизма -94 ins/del ATTG в промоторния регион на NFκB1 гена.

## Научно-приложни

- Показана е подобрена защита на кръвни клетки след третирането им с гелданамицин, MG132, целастрол и лактацистин, съединения, които представляват медицински интерес и биха могли да намерят приложение в лъчетерапевтичната практика като радиопротектори на нормални клетки.
- Протеинът sST2 е подходящ биомаркер за оценка на риска от сърдечно-съдово заболяване при лица, професионално облъчени с ниски дози ЙЛ.

## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. Katsarska O., Zaharieva E., Aneva N., **Savova G.**, Stankova K., Boteva R, “The soluble receptor sST2 is positively associated with occupational exposure to radiation”, International Journal of Radiation Biology, 2015, 92 (2) pp. 87-93.
2. **G. Savova**, K. Stankova, R. Boteva, The natural proteasome inhibitor celastrol can accelerate DNA repair in human lymphocytes, Comptes rendus de l'Acade'mie bulgare des Sciences, 2016, Vol 69, No8, pp.1025-1028.

## УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ

1. O. Katsarska, N. Aneva, E. Zaharieva, **G. Savova**, K. Stankova, R. Boteva, “Can ST2 protein represent a novel ionizing radiation biomarker for potential use in epidemiological studies?”, International conference on radiation protection in medicine, 30 May – 2 June 2014, Varna, Bulgaria.
2. **Gergana Savova**, Nevena Aneva, Katya Stankova, Rayna Boteva „The Proteasome inhibition can modify the levels of inflammatory cytokines in irradiated blood mononuclear cells“, Youth Conference “Kliment days”, 17 November – 18 November 2016, Sofia, Bulgaria.
3. **Gergana Savova**, Katya Stankova, Nevena Aneva, Rayna Boteva „The Hsp90 inhibitor geldanamycin accelerates the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human peripheral blood mononuclear cells“, Youth Conference “Kliment days”, 16 November – 17 November 2017, Sofia, Bulgaria.

## Благодарности

*Искам да изразя своята благодарност и признателност на моя научен ръководител проф. Райна Ботева за съветите и помощта по време на разработването и написването на този дисертационен труд.*

*Благодаря на целия отдел Радиобиология към НЦРРЗ и по-специално на доц. Росица Христова за оказаното съдействие и подкрепа.*

*Благодаря на Катя Станкова и Невена Анева за полезните дискусии, по време на съвместната ни работа.*

*Благодаря на отдел Радиационна безопасност и медицинско осигуряване и на лаборатория Дозиметричен контрол (SSDL) към отдел Радиационна защита на НЦРРЗ за оказаното съдействие при изработването на този труд.*

*Благодаря на проф. Алексей Савов и на Стоян Бичев от Националната генетична лаборатория за помощта и обучението по внедряване на нови лабораторни техники.*

*Благодаря на моето семейство и приятели, които винаги са ме разбирали и са били до мен в трудните моменти. Специални благодарности към моята майка, която неуморно ме подкрепя в изследователския ми път.*



## ЛИТЕРАТУРА

1. ADAMS, J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*, 29 Suppl 1, 3-9.
2. BAKER, J. E., MOULDER, J. E. & HOPEWELL, J. W. 2011. Radiation as a risk factor for cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal*, 15, 1945-56.
3. CHATTERJEE, A., DIMITROPOULOU, C., DRAKOPANAYIOTAKIS, F., ANTONOVA, G., SNEAD, C., CANNON, J., VENEMA, R. C. & CATRAVAS, J. D. 2007. Heat shock protein 90 inhibitors prolong survival, attenuate inflammation, and reduce lung injury in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 176, 667-75.
4. ELLIOTT, P. J., ZOLLNER, T. M. & BOEHNCKE, W. H. 2003. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med (Berl)*, 81, 235-45.
5. FUKUMOTO, R. & KIANG, J. G. 2011. Geldanamycin analog 17-DMAG limits apoptosis in human peripheral blood cells by inhibition of p53 activation and its interaction with heat-shock protein 90 kDa after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, 176, 333-45.
6. GAMA, V., YOSHIDA, T., GOMEZ, J. A., BASILE, D. P., MAYO, L. D., HAAS, A. L. & MATSUYAMA, S. 2006. Involvement of the ubiquitin pathway in decreasing Ku70 levels in response to drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 312, 488-99.
7. GARTON, K. J., GOUGH, P. J. & RAINES, E. W. 2006. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol*, 79, 1105-16.
8. KABAKOV, A. E., KUDRIAVTSEV, V. A. & MAKAROVA IU, M. 2010. [Inhibitors of the heat shock protein 90 activity: a novel class of tumor radiosensitizers]. *Radiats Biol Radioecol*, 50, 528-35.
9. KARBAN, A. S., OKAZAKI, T., PANHUYSEN, C. I., GALLEGOS, T., POTTER, J. J., BAILEY-WILSON, J. E., SILVERBERG, M. S., DUERR, R. H., CHO, J. H., GREGERSEN, P. K., WU, Y., ACHKAR, J. P., DASSOPOULOS, T., MEZEY, E., BAYLESS, T. M., NOUVET, F. J. & BRANT, S. R. 2004. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*, 13, 35-45.
10. KHALAF, H., JASS, J. & OLSSON, P. E. 2010. Differential cytokine regulation by NF-kappaB and AP-1 in Jurkat T-cells. *BMC Immunol*, 11, 26.
11. KIANG, J. G., SMITH, J. T. & AGRAVANTE, N. G. 2009. Geldanamycin analog 17-DMAG inhibits iNOS and caspases in gamma-irradiated human T cells. *Radiat Res*, 172, 321-30.
12. LITTLE, M. P., TAWN, E. J., TZOULAKI, I., WAKEFORD, R., HILDEBRANDT, G., PARIS, F., TAPIO, S. & ELLIOTT, P. 2010. Review and meta-analysis of epidemiological associations between low/moderate doses of ionizing radiation and circulatory disease risks, and their possible mechanisms. *Radiat Environ Biophys*, 49, 139-53.
13. LIU, S. F. & MALIK, A. B. 2006. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L622-L645.
14. LU, X., NURMEMET, D., BOLDUC, D. L., ELLIOTT, T. B. & KIANG, J. G. 2013. Radioprotective effects of oral 17-dimethylaminoethylamino-17-

- demethoxygeldanamycin in mice: bone marrow and small intestine. *Cell Biosci*, 3, 36.
15. MADRIGAL-MATUTE, J., LOPEZ-FRANCO, O., BLANCO-COLIO, L. M., MUNOZ-GARCIA, B., RAMOS-MOZO, P., ORTEGA, L., EGIDO, J. & MARTIN-VENTURA, J. L. 2010. Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 86, 330-7.
  16. MALHOTRA, V., SHANLEY, T. P., PITTET, J. F., WELCH, W. J. & WONG, H. R. 2001. Geldanamycin inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25, 92-7.
  17. OECKINGHAUS, A. & GHOSH, S. 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a000034.
  18. PAHL, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-66.
  19. PEREIRA, S. G. & OAKLEY, F. 2008. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1425-30.
  20. POULAKI, V., ILIAKI, E., MITSIADES, N., MITSIADES, C. S., PAULUS, Y. N., BULA, D. V., GRAGOUDAS, E. S. & MILLER, J. W. 2007. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J*, 21, 2113-23.
  21. RICE, J. W., VEAL, J. M., FADDEN, R. P., BARABASZ, A. F., PARTRIDGE, J. M., BARTA, T. E., DUBOIS, L. G., HUANG, K. H., MABBETT, S. R., SILINSKI, M. A., STEED, P. M. & HALL, S. E. 2008. Small molecule inhibitors of Hsp90 potently affect inflammatory disease pathways and exhibit activity in models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 58, 3765-75.
  22. RODRIGUEZ-MANAS, L., EL-ASSAR, M., VALLEJO, S., LOPEZ-DORIGA, P., SOLIS, J., PETIDIER, R., MONTES, M., NEVADO, J., CASTRO, M., GOMEZ-GUERRERO, C., PEIRO, C. & SANCHEZ-FERRER, C. F. 2009. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*, 8, 226-38.
  23. SANADA, S., HAKUNO, D., HIGGINS, L. J., SCHREITER, E. R., MCKENZIE, A. N. & LEE, R. T. 2007. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*, 117, 1538-49.
  24. SANTOS, D. G., RESENDE, M. F., MILL, J. G., MANSUR, A. J., KRIEGER, J. E. & PEREIRA, A. C. 2010. Nuclear Factor (NF) kappaB polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure. *BMC Med Genet*, 11, 89.
  25. SHIKAZONO, N., NOGUCHI, M., FUJII, K., URUSHIBARA, A. & YOKOYA, A. 2009. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *J Radiat Res*, 50, 27-36.
  26. TUKAJ, S. & WEGRZYN, G. 2016. Anti-Hsp90 therapy in autoimmune and inflammatory diseases: a review of preclinical studies. *Cell Stress Chaperones*, 21, 213-8.
  27. VALEN, G., YAN, Z. Q. & HANSSON, G. K. 2001. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol*, 38, 307-14.
  28. WALCOTT, S. E. & HEIKKILA, J. J. 2010. Celastrol can inhibit proteasome activity and upregulate the expression of heat shock protein genes, hsp30 and hsp70, in *Xenopus laevis* A6 cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 156, 285-93.
  29. WESTERHEIDE, S. D., BOSMAN, J. D., MBADUGHA, B. N., KAWAHARA, T. L., MATSUMOTO, G., KIM, S., GU, W., DEVLIN, J. P., SILVERMAN, R. B. & MORIMOTO,

- R. I. 2004. Celastrols as inducers of the heat shock response and cytoprotection. *J Biol Chem*, 279, 56053-60.
30. YAMAMORI, T., MEIKE, S., NAGANE, M., YASUI, H. & INANAMI, O. 2013. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. *FEBS Lett*, 587, 3348-53.
31. ZHOU, B., RAO, L., PENG, Y., WANG, Y., LI, Y., GAO, L., CHEN, Y., XUE, H., SONG, Y., LIAO, M. & ZHANG, L. 2009. Functional polymorphism of the NFKB1 gene promoter is related to the risk of dilated cardiomyopathy. *BMC Med Genet*, 10, 47.

# **Modify of radiation cell response, molecular mechanisms**

**PhD Thesis, Sofia, 2020**

## **Summary**

The cellular response to ionizing radiation includes radiation-induced DNA damage, DNA repair, chromosomal aberrations and cell death. Therefore, any modification of processes related to the repair of radiation-induced DNA damage, have significant effects on the total cellular response, which aims to overcome the effects of radiation exposure.

The first part of the study analyzes the effects of four modifiers in peripheral blood mononuclear cells – the inhibitor of molecular chaperone Hsp90, geldanamycin and the proteasome inhibitors MG132, celastrol and lactacystin on the DNA repair on one hand and the inflammation response on the other. The pretreatment of the cells with all of the inhibitors accelerates the repair kinetics of radiation-induced double strand breaks, involving the kinase DNA-PKcs in the mechanism. Also we investigated the inflammatory response as a part of radiation response through the levels of cytokines IL-6, IL-8, IL-10 and TNF $\alpha$  and the main pathway of their synthesis via transcriptional factor NF- $\kappa$ B. We found that the four inhibitors can modify the radiation response, by activating mechanisms that increase the resistance of irradiated cells, characterizing them as radioprotectors.

The second part of the present thesis represents a molecular epidemiological study which aims to find whether clinical marker sST2 can be used as a biomarker of radiation-induced cardiovascular diseases in occupationally exposed to low doses nuclear workers. Analyzing the plasma levels of 45 externally exposed to gamma radiation workers from the nuclear industry and of 24 non-exposed controls of comparable age, sex, education and social status, we measured the higher levels of cardiac marker sST2 in the blood plasma of radiation workers in comparison to the non-exposed controls. In addition all subjects were genotyped for the polymorphism -94ins/del ATTG in the promoter region of NF- $\kappa$ B1 gene. There is evidence for a link between this mutation and an increased risk of cardiovascular diseases and we decided to compare the levels of sST2 and the homozygous genotype of the mutation. We did not find the positive correlation in the group of nuclear power plant workers, unlike the control group, where the subject with higher value of sST2 had mutant genotype.