

ОБЛУЧЕНИЕ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА В МАЛЫХ ДОЗАХ ПРИВОДИТ К ОТСРОЧЕННОМУ УСКОРЕНИЮ ПРОЛИФЕРАЦИИ ИХ ПОТОМКОВ

© 2017 г. А.В. Ермакова, И.О. Велегжанинов*

Институт биологии Коми научного центра УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28

*Вятский государственный университет, 610000, Киров, ул. Московская, 36

E-mail: vellio@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.03.17 г.

После доработки 20.04.17 г.

Впервые показано, что однократное воздействие γ -излучения в дозе 3 сГр на фибробласты легких эмбриона человека ФЛЭЧ-104 на ранних пассажах приводит к отдаленной стимуляции пролиферации потомков облученных клеток через 30–37 суток. При этом общие изменения динамики пролиферации в результате облучения в малых дозах (3 и 5 сГр) оказались более выраженными, чем в результате облучения в высокой дозе (2 Гр). Предполагается, что обнаруженный эффект может играть важную роль в формировании специфических эффектов малых доз ионизирующего излучения, обнаруживаемых по интегральным показателям на более высоких уровнях организации живой материи.

Ключевые слова: эмбриональные фибробласты человека, пролиферация, γ -излучение, малые дозы, радиационный гормезис.

Воздействие ионизирующего излучения в высоких дозах вызывает остановку клеточного цикла, которая может стать перманентной, т.е. приводит к замедлению пролиферации клеток [1]. Замедление пролиферации некоторых типов клеток может также быть индуцировано однократным облучением в относительно малых дозах либо хроническим низкоинтенсивным облучением. Например, данный эффект известен при однократном облучении эндотелиальных клеток человека HUVEC в дозе 0,5 Гр [2] и при хроническом низкоинтенсивном (0,042–0,1 сГр/ч) облучении эпителиальных клеток RWPE-1 [3].

Однако эффекты ионизирующего излучения в малых дозах не описываются путем прямой экстраполяции с области высоких доз и часто проявляются нестабильно. Более того, множество исследований свидетельствуют о качественных различиях между эффектами ионизирующего излучения в малых и высоких дозах [4–6]. Одним из основных специфических эффектов ионизирующего излучения в малых дозах является радиационный гормезис, экспериментальные свидетельства которого начали появляться уже в первой половине XX века [7]. С 60-х годов XX века А.М. Кузин с коллегами описывал стимулирующее действие ионизирующего излучения в малых дозах в экспериментах

на растениях и животных, а также искал возможные механизмы данного явления [8]. Сам термин был предложен Т.Д. Лакеем, который в 1980 г. продемонстрировал стимуляцию синтеза ДНК и белка в ответ на облучение в малых дозах [7], что свидетельствует о стимуляции роста и пролиферации клеток. Позже стимуляция пролиферации в ответ на однократное острое облучение в малых дозах (от 2,0 до 7,5 сГр) *in vitro* была показана для остеобластов [9], мезенхимальных стволовых клеток [10] и фибробластов [11–13]. При схожих режимах облучения, но в более высоких дозах (от 7,5 до 50 сГр) эффект наблюдался *in vivo* для кроветворных клеток костного мозга [14,15] и остеобластов мышей [9]. Описанные эффекты сопровождались активацией внутриклеточных сигнальных каскадов MAPK/ERK и PI3K/AKT/mTOR. Ингибирование ключевых элементов данных сигнальных каскадов на момент облучения отменяло проявление данного феномена.

Хроническое низкоинтенсивное облучение также способно вызывать увеличение активности пролиферации клеток. Впервые это было показано для эмбриональных фибробластов человека при облучении нитратом тория (0,4 мГр/сут) [16]. В экспериментах *in vivo* была показана активация пролиферации клеток щитовидной железы мышей линии CBA в ответ

на хроническое воздействие γ -излучения мощностью 0,022 мГр/ч (накопленные дозы 1,6 и 4,8 сГр) и крыс линии Вистар в ответ на облучение мощностью 0,38 мГр/ч (накопленная доза 50 сГр) [17]. Кроме того, сходный эффект был обнаружен у полевок-экономок, отловленных из природных популяций, обитающих на территории с повышенным уровнем радиоактивности [18].

Во всех перечисленных выше случаях ускорение пролиферации происходило либо сразу после острого облучения в малых дозах, либо при действии хронического низкоинтенсивного облучения. Однако существуют сведения, что фракционированное облучение α -частицами в дозе $2,5 \times 8$ сГр (с интервалами четверо суток) приводит к ускорению пролиферации бронхиальных эпителиальных клеток человека Beas-2В, которое сохраняется как минимум в течение двух месяцев культивирования после последнего облучения. При этом в течение того же периода наблюдается повышенный уровень фосфорилирования белков ERK и AKT, что говорит о длительном сохранении активации соответствующих сигнальных каскадов после облучения [19].

В связи с этим возникает вопрос, может ли однократное воздействие γ -излучения в малых дозах изменить динамику пролиферации нормальных не иммортализованных клеток человека. В настоящей работе мы поставили перед собой цель выяснить это, используя в качестве тест-объекта эмбриональные фибробласты ФЛЭЧ-104.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. В исследовании использовали эмбриональные фибробласты легких человека ФЛЭЧ-104 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург). Клеточную культуру поддерживали при 37°C, 5% CO₂ в атмосфере, 100% влажности, в ростовой среде DMEM/F12 (HyClone, Thermo Scientific, США) без антибиотиков, с добавлением пирувата натрия («ПанЭко», Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Thermo Scientific, США).

Облучение и оценка скорости пролиферации с помощью световой микроскопии. Для анализа радиационно-индуцированных изменений динамики пролиферации клеточную культуру подвергали воздействию ионизирующего излучения в дозах 0 (имитация облучения), 3 и 5 сГр, а также 2 и 6 Гр, с использованием устройства «Theratron Equinox» (Best Theratronics Ltd, Канада). Источником излучения являлся ⁶⁰Co,

мощность дозы составляла 2,6 сГр/с. Мощность дозы измеряли с помощью дозиметра DOSE-1, оборудованного детектором ионизационного типа (IBA Dosimetry, Германия). Во время облучения и имитации облучения адгезионные культуры на ростовой поверхности 24- или 96-луночных планшетов, а также культуральных флаконов площадью 25 см² с вентилируемыми крышками находились в одинаковых условиях при комнатной температуре. При этом воздействие осуществляли сверху вниз через слой ростовой среды толщиной 6 мм. Время экспозиции составило 1,2 с (3 сГр), 1,9 с (5 сГр), 77 с (2 Гр), 231 с (6 Гр).

Скорость пролиферации оценивали по увеличению количества клеток на единицу площади ростовой поверхности за интервалы времени между пересадками после облучения. Подсчет клеток осуществляли в десяти полях зрения для каждой повторности эксперимента при увеличении 63 \times при помощи микроскопа БИОЛАМ-П1 («ЛОМО», Россия). Эксперименты выполняли в шести биологических повторностях. В первой серии экспериментов динамику пролиферации оценивали вплоть до полной остановки роста культуры. Во второй серии – в течение первых четырех суток после облучения.

Оценка скорости пролиферации с помощью метода флуориметрического анализа цитотоксичности в микрокультурах. Верификацию изменений скорости пролиферации, обнаруженных методом прямого подсчета, осуществляли в отдельной серии экспериментов с использованием флуориметрического анализа цитотоксичности в микрокультурах при помощи спектрофлуориметра «Флюорат-02-Панорама» с автоматической приставкой «Микроскан» (ООО «Люмэкс», Санкт-Петербург). Изначально этот метод был разработан для тестирования токсической активности фармакологических субстанций [20]. Метод позволяет оценить количество живых клеток в лунке культурального планшета по степени гидролиза флуоресцеин диацетата, происходящего при взаимодействии с интактными клеточными мембранами.

Для оценки скорости пролиферации в ранний период после облучения фибробласты, посеянные в 96-луночные планшеты (по 300 клеток в лунку), облучали в дозах, указанных выше. Одну и ту же суспензию клеток рассеивали на 21 планшет. Использовали три планшета на каждый вариант облучения и контроль, а также три планшета для оценки флуоресцентного сигнала от стартового количества клеток, анализируемого в день облучения. Конечное количество клеток анализировали спустя 11 суток после облучения. Соотношение результатов, по-

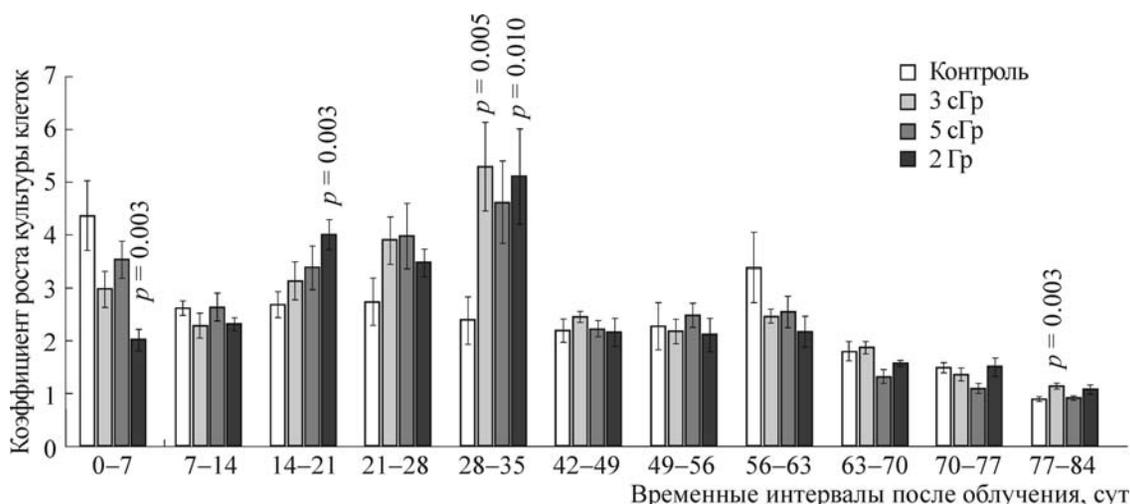


Рис. 1. Динамика пролиферации клеток ФЛЭЧ-104 после облучения в дозах 3 и 5 сГр, а также 2 Гр. Представлены объединенные данные шести независимых биологических повторностей эксперимента; p – вероятность нулевой гипотезы, полученная при сравнении варианта с соответствующим контролем с помощью t -критерия Стьюдента (указана только для различий, статистически значимых с учетом поправки Бонферрони).

лученных на 11-е сутки, с результатами, полученными со стартовых планшетов, использовали как коэффициент роста культуры за указанный промежуток времени. Для оценки отсроченного изменения скорости пролиферации фибробласты облучали в культуральных флаконах площадью 25 см². На 29-е сутки после облучения клетки пересевали в 96-луночные планшеты, как описано выше, но в данном случае для каждого варианта воздействия использовали свои стартовые планшеты. Анализировали количество клеток на 30-е и 37-е сутки после облучения и рассчитывали скорость роста культур, облученных в различных дозах.

В день анализа из лунок планшета удаляли питательную среду, монослойную культуру промывали 200 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (рН 7,4). Добавляли по 100 мкл раствора диацетата флуоресцеина (Sigma, США) в лунки и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности в течение 40 мин, после чего производили измерения на спектрофлуориметре (длина волны возбуждения 485 нм, регистрация при 520 нм).

Статистическая обработка. Выборки проверяли на наличие артефактов с помощью критерия Граббса. Различия между вариантами оценивали с помощью t -критерия Стьюдента в программе Statistica 6.0. Статистически значимыми принимали различия, удовлетворяющие условиям поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы обнаружить отдаленные эффекты облучения в малых дозах на динамику

пролиферации эмбриональных фибробластов человека, была проведена оценка количества клеток на единицу площади адгезионных культур, облученных на ранних пассажах в дозах 3, 5 и 200 сГр. Как и ожидалось, облучение в дозе 2 Гр приводило к замедлению пролиферации в ранний срок после облучения (рис. 1). Интересно, что облучение в дозах 3 и 5 сГр также вызывало тенденцию к снижению скорости пролиферации относительно необлученного контроля, несмотря на то, что для многих аналогичных экспериментальных моделей известен обратный эффект [11–13]. В период с седьмых по четырнадцатые сутки после облучения скорость пролиферации потомков фибробластов, облученных в дозе 2 Гр, оказалась выше, чем в контроле. Аналогичная тенденция наблюдалась в культурах, облученных в малых дозах, и становилась более выраженной в период с 21-х по 28-е сутки. В период с 28-х по 35-е сутки скорость пролиферации потомков клеток, облученных в дозах 3 сГр и 2 Гр, была значительно более высокой, чем скорость пролиферации потомков необлученных клеток. В более поздние периоды измерения, вплоть до полной остановки роста культуры, значительные различия не наблюдались. Исключение составляет факт более длительного сохранения способности к пролиферации культуры фибробластов, облученной в дозе 3 сГр.

Для того чтобы доказать воспроизводимость наблюдаемых изменений динамики пролиферации фибробластов, была выполнена оценка количества клеток с помощью флуориметрического анализа цитотоксичности в мик-

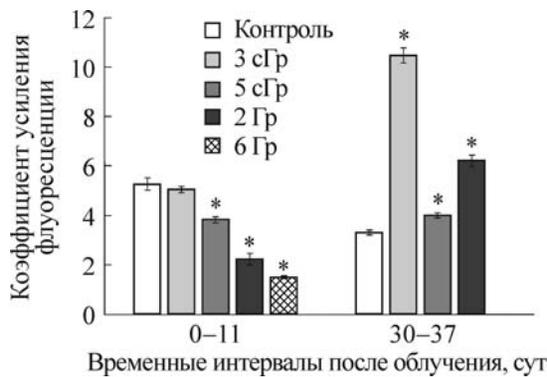


Рис. 2. Оценка скорости пролиферации клеток ФЛЭЧ-104 с помощью метода флуориметрического анализа цитотоксичности в микрокультурах в первые 11 суток и в течение 30–37-и суток после облучения в дозах 3 и 5 сГр, а также 2 и 6 Гр. Представлены усредненные данные тестирования 288 микрокультур для каждого варианта эксперимента; * – различия с контролем достоверны при $p < 0,00005$ (t -критерий Стьюдента).

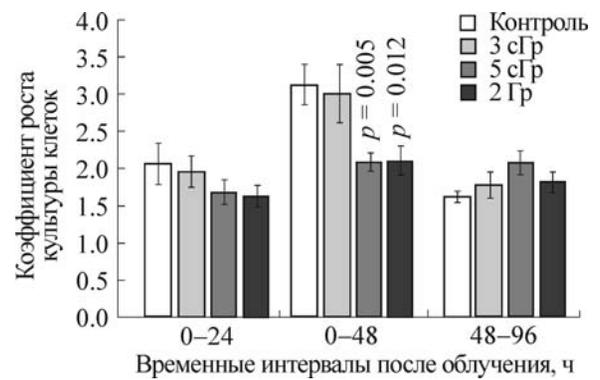


Рис. 3. Скорость пролиферации клеток ФЛЭЧ-104 в первые 96 ч после облучения в дозах 3 и 5 сГр, а также 2 Гр. Представлены объединенные данные шести биологических повторностей эксперимента; p – вероятность нулевой гипотезы, полученная при сравнении варианта с соответствующим контролем с помощью t -критерия Стьюдента (указана только для различий, статистически значимых с учетом поправки Бонферрони).

рокультурах [20] (рис. 2). Эксперимент выполняли в трех повторностях, содержащих по 96 микрокультур для каждого варианта воздействия. Результаты показывают, что облучение эмбриональных фибробластов в дозах 3 и 5 сГр не приводит к ускорению пролиферации клеток в первые дни после воздействия. Напротив, после облучения в дозе 5 сГр наблюдается значительное замедление деления клеток. Спустя 30 суток потомки клеток, облученных в дозе 3 сГр, пролиферируют более чем в два раза быстрее. Приблизительно на 70% увеличивается скорость деления потомков клеток, выживших после облучения в дозе 2 Гр.

Эффект радиационно-индуцированной стимуляции пролиферации был многократно показан различными авторами в течение первых нескольких суток после облучения [10–14]. Так как выбранные нами для исследований фибробласты пролиферируют достаточно медленно, мы использовали более длинные интервалы измерения после облучения (семь и одиннадцать суток). В данных условиях мы наблюдали снижение скорости деления клеток после облучения в малых дозах. Для того чтобы более точно оценить, в какой момент после облучения проявляется данный эффект, мы проанализировали скорость пролиферации в интервалах 0–24, 0–48 и 48–96 ч после облучения (рис. 3). Результаты свидетельствуют о том, что в нашей экспериментальной системе снижение скорости деления клеток проявляется в первые 48 ч после облучения, а статистически более выраженные изменения, которые мы наблюдали в пределах более продолжительного интервала, являются

следствием увеличения ранних различий в геометрической прогрессии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже упоминалось выше, существуют экспериментальные сведения, что стимуляция пролиферации клеток млекопитающих в ответ на воздействие ионизирующего излучения в малых дозах обусловлена активацией внутриклеточных сигнальных каскадов MAPK/ERK и PI3K/AKT/mTOR. Ингибирование ключевых элементов данных сигнальных каскадов на момент облучения отменяет проявление данного феномена облучения [10–14]. Однако все перечисленные выше исследования констатируют эффект стимуляции пролиферации и увеличения уровня фосфорилирования белков ERK1, ERK2 и AKT в первые сутки после острого облучения в малых дозах. Если говорить о кратковременном облучении, исключением является работа [19], в которой кратковременное фракционированное восьмикратное воздействие α -частиц в дозе $2,5 \times 8$ сГр приводило к ускорению пролиферации эпителиальных клеток бронхов человека, наблюдаемому в течение двух месяцев после последнего облучения. Кроме того, в течение указанного периода наблюдался постоянно повышенный уровень фосфорилирования белков ERK, AKT и p38. Авторы делают вывод, что фракционированное облучение α -частицами в малых дозах приводит к увеличению потенциала малигнизации эпителиальных клеток бронхов человека. Подобный эффект может лежать в основе наблюдаемых в некоторых ис-

следованиях весьма противоречивых результатах, свидетельствующих об увеличении риска онкологических заболеваний при воздействии ионизирующих излучений в малых дозах [21–23]. Однако вероятность воздействия на население α -излучения значительно меньше, чем γ -излучения, ввиду его низкой проникающей способности. Кроме того, характер повреждений от данных типов излучения различен.

В настоящей работе впервые показано, что однократное воздействие γ -излучения в дозе 3 сГр на эмбриональные фибробласты легких человека приводит к выраженным изменениям динамики клеточного деления, проявляющимся до полного исчерпания пролиферативного потенциала. Важно отметить, что эффект облучения в столь малой дозе по данному показателю был более выраженным, чем эффект облучения в высокой дозе (2 Гр). В первые сутки после воздействия наблюдалось замедление клеточного деления, тогда как потомки облученных клеток пролиферировали значительно быстрее на 30–37-е сутки, а также перед полной остановкой роста культуры на 77–84-е сутки. Известно, что человеческие фибробласты характеризуются крайне низкой вероятностью малигнизации *in vitro* даже под действием канцерогенов [24]. Кроме того, в проведенных нами экспериментах клетки культивировали до полной остановки роста и случаев полной трансформации не наблюдалось. В связи с этим мы не можем говорить о том, что облучение в дозе 3 сГр приводило к повышению риска малигнизации фибробластов, и о том, что данный феномен может вносить вклад в повышение риска канцерогенеза *in vivo*. Однако мы не можем отрицать потенциальное значение радиационно-индуцированного изменения динамики пролиферации потомков облученных клеток в формировании специфических эффектов малых доз, обнаруживаемых на уровне целого организма по различным интегральным показателям.

ВЫВОДЫ

Однократное воздействие γ -излучения в дозе 3 сГр на фибробласты легких эмбриона человека *in vitro* приводит к отдаленному ускорению пролиферации потомков облученных клеток. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение роли в обнаруженном феномене активации сигнальных каскадов MAPK/ERK и PI3K/AKT/mTOR, который наблюдался при немедленной радиационно-индуцированной стимуляции пролиферации в схожих экспериментальных системах.

При выполнении работы использовано оборудование ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии Коми НЦ УрО РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-34-00367).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. M. Day, A. L. Snow, and R. A. Panganiban, *Cell Cycle* **13** (13), 2011 (2014).
2. J.-Z. Guan, W. P. Guan, T. Maeda, and N. Makino, *Mol. Cell. Biochem. J.* **396** (1–2), 129 (2014).
3. J. T. McDonald, C. Briggs, H. Szelag, et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **11** (2014).
4. I. O. Velegzhaninov, D. M. Shadrin, Y. I. Pylina, et al., *Dose-Response* **13**, 1 (2015).
5. L. H. Ding, M. Shingyoji, F. Chen, et al., *Radiat. Res.* **164** (2005).
6. I. Nosel, A. Vaurijoux, J. F. Barquinero, and G. Gruel, *DNA Repair (Amst.)* **12** (7), 508 (2013).
7. T. D. Luckey, *Health Phys.* **43** (6), 771 (1982).
8. А. М. Кузин, *Изв. РАН. Сер. биол.* **34** (6), 824 (1993).
9. M. Chen, Q. Huang, W. Xu, et al., *PLoS One* **9** (8) (2014).
10. X. Liang, Y. H. So, J. Cui, et al., *J. Radiat. Res.* **52** (3) 380 (2011).
11. K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe, *Cancer Res.* **61** (14), 5396 (2001).
12. C. S. Kim, J. K. Kim, S. Y. Nam, et al., *Mol. Cells* **24** (3), 424 (2007).
13. X. Liang, G. Gu, D. Yu, et al., *Dose-Response* **10** (2016).
14. W. Li, G. Wang, J. Cui, et al., *Exp. Hematol.* **32** (11), 1088 (2004).
15. G. J. Wang and L. Cai, *Toxicol. Sci.* **53** (2) 369 (2000).
16. F. Croute, S. Vidal, J. P. Soleilhavoup, et al., *Exp. Gerontol.* **21** (1), (1986).
17. А. В. Павлов, О. В. Ермакова и Т. В. Кораблева, *Морфология* **43** (2013).
18. О. В. Раскоша, О. В. Ермакова, А. В. Павлов и Т. В. Кораблева, *Радиационная биология. Радиозэкология* **55** (1), 63 (2015).
19. W. Liu, L. Xiao, Ch. Dong, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **447** (2014).
20. L. Lindhagen, P. Nygren, and R. Larsson, *Nature Protocols* **3**, 1364 (2008).
21. J. D. Mathews, A. V. Forsythe, Z. Brady, et al., *Brit. Med. J.* **346**, f2360 (2013).
22. M. S. Sasaki, A. Tachibana, and S. Takeda, *J. Radiat. Res.* **55** (3), 391 (2014).
23. K. Suzuki and Sh. Yamashita, *Jpn. J. Clin. Oncol.* **42** (7), 563 (2012).
24. J. J. McCormick and V. M. Maher, *Mut. Res.* **199** (2), 271 (1988).

Low Dose Irradiation of Human Fibroblasts Leads to Delayed Acceleration of Proliferation of Their Progeny

A.V. Ermakova* and I.O. Velegzhaninov**

**Institute of Biology, Komi Science Centre of the Ural Division, Russian Academy of Sciences,
ul. Kommunisticheskaya 28, Syktyvkar, 167982 Russia*

***Vyatka State University, ul. Moskovskaya 36, Kirov, 610000 Russia*

We have demonstrated for the first time that single exposure to gamma-radiation with a dose of 3 cGy on human embryonic lung fibroblasts, HELF-104, in early passages leads to the delayed stimulation of proliferation of the progeny of irradiated cells by 30–37 days. Moreover, the general changes in dynamics of proliferation after irradiation with small doses (3 and 5 cGy) are more pronounced than after the high dose irradiation (2 Gy). We suggest that this effect may play an important role in the formation of the specific effects of low doses of ionizing radiation, detected by integral endpoints at higher levels of organization of living matter.

Keywords: human embryonic fibroblasts, proliferation, γ -radiation, low doses, radiation hormesis