Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна»
Федерального медико-биологического агентства России

На правах рукописи

Усупжанова Дарья Юрьевна

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МАЛЫХ И СРЕДНИХ ДОЗ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

1.5.1 – «Радиобиология»

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор медицинских наук, доцент
руководитель центра биомедицинских и
аддитивных технологий
Т.А. Астрелина

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 4
ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 14
1.1. Мезенхимальные стромальные клетки: характеристика и роль в организме человека 14
1.1.2. Поверхностные антигены МСК 18
1.1.2. Секреторный профиль МСК 23
1.2. Радиочувствительность стволовых клеток 32
1.3. Эффекты малых доз радиации 36
1.3.1. Двунитевые разрывы ДНК 37
1.3.2. Радиационный гормезис 38
1.3.3. Адаптивный ответ 41
1.3.4. Радиочувствительность и радиорезистентность 42
1.3.5. Геномная нестабильность 43
1.3.6. Эффект свидетеля 44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 50
2.1. Дизайн исследования 50
2.2. Выделение культуры МСК из образца слизистой ткани десны 50
2.3. Культивирование клеточной линии 52
2.4. Криоконсервирование клеточной линии 54
2.5. Криоконсервирование и хранение кондиционированных сред 54
2.6. Условия облучения 55
2.7. Иммунофенотипирование клеток 55
2.8. Оценка концентрации общего белка в кондиционированной среде 56
2.9. Иммуноферментный анализ 57
2.10. Оценка пролиферативной активности клеток 57
2.11. Оценка клеточных поколений 58
2.12. Культивирование необлученных МСК в кондиционированных средах облученных культур клеток 58

2.13. Статистический анализ 59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 60
3.1. Изменения профиля поверхностных антигенов МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения 60
3.2. Изменения секреторного профиля МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения 72
3.3. Изменения пролиферативной активности и состава клеточных поколений МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения 88
3.4. Изменения пролиферативной активности необлученных МСК при их культивировании в кондиционированных средах, полученных от облученных МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения 98
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 103
ВЫВОДЫ 106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 108
БЛАГОДАРНОСТЬ 120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1xPBS – однократный фосфатный буфер

7AAD – 7-аминоактиномицин D

CD – кластер дифференцировки

DAMPs – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями

FBS– фетальная бычья сыворотка

g – величина центробежного ускорения

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IDO – индоламин-2,3-диоксигеназа

IFN – интерферон

Ig – иммуноглобулин

MHC – главный комплекс гистосовместимости

TGF – трансформирующий фактор роста

Th – Т-хэлперы

SCFR – рецептор фактора роста стволовых клеток

TLR – толл-подобные рецепторы

TNF – фактор некроза опухоли

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

АГ – антиген

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АЭС – атомная электростанция

Гр – Грей

ГСК – гематопоэтические стволовые клетки

ДК – дендтритные клетки

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ионизирующее излучения

ИЛ – интерлейкин

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

кДа – килоДальтон

КИ – клеточный индекс

КМ – костный мозг

мА – миллиампер

мГр – миллиГрей

мЗв – миллиЗиверт

МКРЗ – Международный комитет по радиационной защите

мМ – миллимоль

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

НКИ – нормализованный клеточный индекс

РНК – рибонуклеиновая кислота

сГр – сантиГрей

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

На протяжении жизни человек неизбежно подвергается воздействию малых доз (от 10 до 100 мГр [1]) ионизирующего излучения (ИИ), как фонового, так и в рамках медицинской диагностики и лечения, от свалок радиоактивных отходов, в ходе профессиональной деятельности, а также авиаперелетов [2]. Международный комитет по радиационной защите (МКРЗ) обозначил критические значения малых доз ИИ для человека в диапазоне от 20 до 50 мГр в год [1]. Учитывая неизбежно растущее количество источников малых доз ИИ в современном мире, а также результаты исследований, демонстрирующих получение некоторыми группами населения в рамках медицинских исследований кумулятивной дозы облучения равной 50 мГр/год [3], можно сказать, что точная оценка рисков, связанных с облучением в малых дозах, является важной задачей общественного здравоохранения.

На сегодняшний день оценка эффектов, оказываемых малыми дозами ИИ на организм человека в целом, не представляется возможной, в связи с этим мезенхимальные стромальные клетки (МСК), являющиеся регенеративным резервом взрослого организма, выступают перспективной моделью для изучения эффектов облучения малыми дозами. Благодаря своей способности к самоподдержанию, МСК находятся в организме человека длительный период времени и могут подвергаться нескольким раундам облучения, накапливая в себе произошедшие изменения и передавая их следующим поколениям клеток, поскольку обладают потенциями к дифференцировке. В конечном итоге, изменения, произошедшие в МСК – регенеративном резерве организма, отражаются на организме человека в целом. Таким образом, качественные и количественные изменения характеристик МСК могут быть рассмотрены в качестве критериев оценки рисков воздействия облучения в малых дозах на организм человека [2], а сами МСК как модель для оценки индивидуальной радиочувствительности

человека, в частности, людей, задействованных в работе в секторе атомной промышленности.

В опубликованных исследованиях, посвященных изучению стохастических и нераковых эффектов, оказываемых облучением в малых дозах, на сегодняшний день существует ряд противоречий. С одной стороны, результаты некоторых исследований свидетельствуют о негативном влиянии малых доз ИИ. В частности, в клетках происходит накопление двунитевых разрывов ДНК [4], и, поскольку каждый двунитевой разрыв гипотетически имеет возможность индуцировать клеточную трансформацию, на сегодняшний день этот критерий считается одним из наиболее значимых для оценки эффекта дозы. На основании этого МКРЗ придерживается беспороговой линейной концепции, согласно которой оказываемый эффект прямо пропорционален полученной дозе облучения [2]. Бесспорно, описанная концепция применима при прогнозировании эффектов больших доз радиации, однако результаты некоторых исследований ставят под сомнение справедливость данной концепции для оценки эффектов, оказываемых облучением в малых дозах. Это связано с тем, что некоторые исследователи указывают на стимулирующие эффекты облучения малыми дозами ИИ [5]. Упоминания о подобных эффектах все чаще встречаются в исследованиях последних лет и позволяют предположить, что в диапазоне малых доз ИИ эффект может быть не пропорционален полученной дозе облучения, что согласуется с пороговой концепцией [6]. В целом, на сегодняшний день результаты исследований о закономерностях развития эффектов, оказываемых малыми дозами ИИ, и механизмах, лежащих в их основе, неоднозначны, поэтому настоящее исследование представляется актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Источники больших доз ИИ на Земле обладают мощнейшей разрушительной и поражающей силой, и на сегодняшний день влияние

больших доз ИИ на организм человека достаточно хорошо изучено, однако в большинстве случаев их источники носят техногенный и частный характер, в то время как источники малых доз ИИ окружают нас повсеместно – от космической радиации до медицинских процедур. И именно потому, что облучение малыми дозами радиации не оказывает столь выраженного повреждающего действия на организм человека, их изучению ранее не придавалось большого значения.

Сегодня же область малых доз ИИ все больше привлекает внимание исследователей: многие ученые указывают на наличие специфических эффектов в данном диапазоне доз. Точные механизмы и закономерности, лежащие в основе данных явлений, все еще остаются комплексно неизученными, а получаемые в проводимых исследования результаты многогранны и сложны за счет вовлеченности в реализацию наблюдаемых эффектов множества факторов. Также важно учитывать различия в степени радиочувствительности клеток в зависимости от их тканевой принадлежности, возраста и степени дифференцированности, что вызывает определенные сложности в интерпретации полученных результатов и сопоставлении данных различных исследований. Помимо этого, результаты исследований различных лабораторий зачастую не коррелируют друг с другом из-за использования различных биологических моделей или источников излучения, а также сроков наблюдения. Таким образом, настоящее исследование посвящено изучению эффектов малых доз ИИ, имеющих важное фундаментальное и прикладное значение.

Цель исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния малых и средних доз рентгеновского излучения, а также кондиционированных сред, полученных от облученных клеток, на мезенхимальные стромальные клетки человека в ранние и отдаленные сроки культивирования после воздействия.

Задачи:

1. Изучить изменения состава профиля поверхностных антигенов МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.
2. Выявить изменения секреторного профиля МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.
3. Исследовать изменения пролиферативной активности и состава клеточных поколений МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.
4. Выявить изменения пролиферативной активности необлученных МСК при их культивировании в кондиционированных средах, полученных от облученных МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.

Научная новизна

1. Впервые показано влияние рентгеновского излучения в диапазоне малых и средних доз на профиль поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны человека и предложено использование данного критерия для оценки рисков, связанных с воздействием ИИ на организм человека.
2. Впервые установлено, что эффекты, развивающиеся в МСК слизистой ткани десны человека под влиянием рентгеновского излучения в диапазоне малых доз, в отдаленные сроки культивирования после облучения сопоставимы с эффектами, развивающимися под влиянием рентгеновского излучения в диапазоне средних доз.
3. Впервые показано, что эффекты, развивающиеся в необлученных клетках под влиянием факторов кондиционированных сред, полученных от МСК слизистой ткани десны человека, облученных в малых дозах, отличаются от эффектов, развивающиеся под влиянием факторов кондиционированных сред, полученных от МСК, облученных в средних дозах ИИ.

4. Впервые предложено использование биологической модели МСК слизистой ткани десны для оценки индивидуальной радиочувствительности человека.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых сведений об эффектах малых доз рентгеновского излучения на мезенхимальные стромальные клетки человека, являющихся регенеративным резервом организма человека. Результаты представленного фундаментального исследования могут быть использованы при чтении лекционных курсов по программе «Радиобиология» в ВУЗах.

Практическая значимость работы обоснована невозможностью оценки влияния облучения малыми дозами на организм человека в целом, в частности, в связи с многофакторностью воздействия окружающей среды. Культура клеток МСК слизистой ткани десны человека благодаря своей биологической доступности (малой инвазивности процедуры получения биоматериала для выделения клеток), простоты выделения и стабильности получаемой клеточной линии может быть предложена в качестве удобной модели для изучения эффектов малых доз ИИ и оценки индивидуальной радиочувствительности человека с целью прогнозирования развития лучевых реакций. Также, благодаря доступности, стандартизации и точности метода проточной цитофлуориметрии, используемого для иммунофенотипирования клеток, поверхностные антигены МСК могут выступить в качестве перспективного критерия оценки рисков воздействия ИИ на организм человека.

Методология и методы исследования

Научная методология исследования основывается на системном подходе к изучаемой проблеме и использовании современных точных методов исследований, комплексно отражающих наблюдаемые изменения и

закономерности. На протяжении всего исследования осуществлялось культивирование клеточной линии. Для оценки клеточных поколений, клеточного цикла, выживаемости, а также иммунофенотипирования облученных клеток был использован метод проточной цитофлуориметрии и соответствующие флуоресцентные коммерческие наборы производителя. Оценка пролиферативной активности клеток оценивалась в режиме реального времени, как параметр электрического сопротивления на приборе xCelligence RTCA. Оценка концентрации белка в кондиционированной среде осуществлялась на флуориметре Qubit 4.0 за счет связывания белков-мишеней с красителем производителя. Секреторный профиль кондиционированных сред оценивался методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (Statsoft, США). Значимость различий оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента для связанных выборок. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов не менее трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

Исследование проведено на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны человека изменяется под влиянием облучения в дозах 50, 100 и 250 мГр в ранние сроки культивирования после облучения.

2. Облучение в малых дозах ИИ оказывает стимулирующее действие на пролиферативную активность и секреторный профиль МСК

слизистой ткани десны человека в ранние сроки культивирования после облучения, в отдаленные сроки эффекты облучения в малых дозах 50 и 100 мГр сопоставимы с эффектами облучения в средних дозах 250 и 1000 мГр.

3. Эффекты, оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК слизистой ткани десны человека в ранние сроки культивирования после облучения малыми дозами 50 и 100 мГр, отличаются от эффектов, оказываемых факторами кондиционированных сред, полученных от МСК после облучения средними дозами 250 и 1000 мГр.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается объемом фактического материала, для исследования которого использовалось высокоточное сертифицированное оборудование, проходящее регулярные внешние и внутренние контроли качества и необходимую калибровку перед началом каждого эксперимента, а также использованием достоверных методов исследования, качеством проведения лабораторных исследований, валидностью получаемых количественных значений признака и использованием методов статистической обработки данных, подходящих под условия проводимого эксперимента.

Апробация диссертации проведена на заседании секции №2 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Материалы диссертации представлены на школе-конференции молодых ученых «Ильинские чтения-2018», конкурсе секции «Молодые профессиональные» в рамках 5-ого Европейского конгресса Международной ассоциации радиационной защиты (5th European IRPA Congress, Гаага, Нидерланды), Международной научной конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», II Межрегиональной молодежной научной конференции «Достижения и перспективы молодых ученых», 64ой ежегодной встрече Общества физики здоровья (64th Annual Meeting Health Physics Society, США, Орландо, Флорида), 3-й Российской научной

конференции с международным участием «Радиобиологические основы лучевой терапии», школе-конференции молодых ученых «Ильинские чтения 2019» , а также IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине, III Научно-практической конференции с международных участием «Научный авангард», посвященной 75-летию ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

По материалам работы опубликовано 7 печатных работ входящих в Перечнь журналов рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из которых 5 публикаций включены в международные базы цитирования.

Структура и объем диссертации

Исследование выполнено на базе Центра Биомедицинских и аддитивных технологий (ЦБМиАТ) ФГБУ ГНЦ ФБМЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, иллюстрирована 32 рисунками и состоит из введения, обзора литературных данных, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 150 литературных источников: 3 – отечественных и 147– иностранный автор.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Мезенхимальные стромальные клетки: характеристика и роль в организме человека

Стволовые клетки – это недифференцированные клетки организма, обладающие способностью к самообновлению, самоподдержанию и потенциями к дифференцировке в специализированные клетки различных тканей и органов.

Стволовые клетки можно классифицировать по степени дифференцировочного потенциала на: тотипотентные, плюрипотентные, мультипотентные и олигопотентные стволовые клетки [7]. Тотипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в любой тип клеток. Они способны образовать новый жизнеспособный организм или регенерирующую его часть. К ним относится оплодотворённая яйцеклетка, или зигота. Плюрипотентные стволовые клетки – потомки тотипотентных стволовых клеток, к которым относятся клетки, полученные из внутриклеточной массы бластоцисты на ранних стадиях развития эмбриона, а также ИПСК, полученные в процессе перепрограммирования зрелых клеток организма. Они способны давать начало практически всем тканям и органам, за исключением экстра-эмбриональных тканей (например, тканей плаценты), сохраняя при этом генетическую стабильность. Из плюрипотентных стволовых клеток развиваются три зародышевых листка: эктодерма, мезодерма и энтодерма. Мультипотентные стволовые клетки способны дифференцироваться в различные типы клеток в пределах одного зародышевого листка. Они могут быть выделены из различных тканей взрослого организма – костного мозга, кожи, волос и т.д. Олигопотентные стволовые клетки – постнатальные клетки, способные дифференцироваться только в один тип клеток [7].

Также стволовые клетки можно классифицировать в зависимости от срока их развития и источника получения на эмбриональные, фетальные,

перинатальные (плацента, пуповинная кровь), постнатальные (клетки взрослого организма) и индуцированные [8].

Обратимся к постнатальным стволовым клеткам, к ним относятся гемопоэтические (кроветворные) стволовые клетки (ГСК), мультипотентные стромальные (мезенхимальные) стволовые клетки и тканеспецифичные клетки-предшественницы

Гемопоэтические стволовые клетки представляют собой мультипотентные стволовые клетки, способные давать начало всем типам клеток кроветворного ряда, включая миелоидные (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакариоциты/тромбоциты и дендтритные клетки) и лимфоидные клетки (Т-клетки, В-клетки и NK-клетки). ГСК могут быть выделены из костного мозга (КМ), пуповинной крови, а также периферической крови после проведения медикаментозной стимуляции их выхода из КМ. Благодаря их способности восстанавливать кроветворную систему они широко используются в медицинской практике для лечения различных гематологических заболеваний: иммунодефицитов, врожденной нейтропении, злокачественных новообразований [9].

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) – это стволовые клетки организма, которые также обладают способностью к самоподдержанию и могут быть изолированы практически из всех тканей человека и животных. Свойство мультипотентности позволяет МСК дифференцироваться в мезодермальном направлении, в частности: остеоциты, адипоциты, ходроциты, клетки скелетной мускулатуры, кардиоциты, теноциты и эндотелиальные клетки [8]. Благодаря потенции к дифференцировке в различных направлениях МСК считаются регенеративным резервом взрослого организма.

В организме человека МСК реализуют иммуномодулирующее действие посредством прямого и опосредованного (секреция цитокинов, факторов роста и т. д.) их взаимодействия практически со всеми клетками иммунной

системы. Они способны оказывать системный противовоспалительный иммунносупрессивный эффект путем угнетения Т-клеточного иммунитета посредством ингибирования активации и пролиферации самих Т-клеток или путем супрессии прогениторных CD34+ клеток, а также ингибирования антиген презентирующей функции и дифференцировки дендритных клеток [10]. В ряде исследований была продемонстрирована способность МСК ингибировать пролиферацию, дифференцировку и продукцию антител В-клетками *in vitro*, а также снижать пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксичность NK-клеток [11]. Помимо этого, под воздействием определенных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов МСК способны мигрировать и задерживаться в местах воспаления и повреждения [12]. Там они оказывают местное репаративное действие за счет дифференцировки в тканеспецифичные типы клеток или выделения растворимых факторов с противовоспалительной и тканезаживляющей активностью [13].

Для общемирового понимания термина МСК Международным обществом клеточной терапии были предложены минимальные критерии, характеризующие мезенхимальные стволовые клетки: адгезия к культуральному пластику, способность дифференцироваться в трех направлениях – в остеоциты, хондроциты и адипоциты, а также экспрессия определенного профиля поверхностных антигенов, в частности, CD73, CD90, CD105, с одновременным отсутствием на поверхности маркеров– CD14 или CD11b, CD34, CD45, CD19 или CD79α и HLA-DR [14]. Важно, что благодаря низким уровням экспрессии молекул HLA I и II класса, а также ко-стимулирующих молекул CD80, CD86, CD40, МСК рассматриваются, как неиммуногенные клетки, пригодные для аллогенной трансплантации пациентам.

Данные критерии справедливы для МСК из различных источников, хотя между ними и могут существовать некоторые различия. Так, например, в профиле поверхностных антигенов МСК из некоторых источников, могут быть позитивными такие маркеры, как CD29, CD44, CD146, CD140b, CD54

(ICAM 1), CD106 (VCAM-1), CD166. В частности, маркер Stro-1 присутствует на поверхности МСК костного мозга и слизистой ткани десны, но отсутствует у МСК жировой ткани [15].

Впервые МСК были выделены из костного мозга Фреденштейном, как быстро делящиеся клетки веретеновидной формы, обладающие способностью адгезироваться к поверхности культурального пластика и образовывать колонии [16]. Сегодня МСК могут быть изолированы из различных источников: жировой ткани, слизистой ткани десны, пупочного канатика, вартонового студня, амниотических жидкости и мембраны, эндометрия, периферической и менструальной крови, плаценты и плодной оболочки, слюнных желез, кожи и крайней плоти, синовиальной жидкости, волос и мочи [8].

Первичная культура клеток МСК, выделенная из ткани, благодаря своей способности к самоподдержанию, может некоторое время культивироваться на поверхности культурального пластика в питательной культуральной среде без возникновения серьезных генетических и функциональных нарушений. При длительном культивировании *in vitro* в МСК происходит снижение теломеразной активности, что приводит к укорачиванию теломерных участков хромосом и является одной из причин старения МСК от пассажа к пассажу. Наряду с этим клетки претерпевают морфологические изменения и снижение потенциала к дифференцировке [17].

Следует отметить, что важную роль в процессах жизнедеятельности МСК играют условия культивирования, включая состав питательной культуральной среды. В частности, использование сыворотки и ростовых факторов на отдаленных пассажах может быть ассоциировано со злокачественной трансформацией клеток, а культивирование в бессывороточной среде приводит к снижению дифференцировочного потенциала и теломеразной активности клеток, и все же на поздних сроках культивирования хромосомные аберрации в них не наблюдаются [18].

Особое внимание привлекают МСК, выделенные из слизистой ткани десны человека, поскольку процедура забора биоматериала малоинвазивна и малотравматична, а сама выделенная клеточная линия достаточно стабильна, обладает выраженными иммуномодулирующими свойствами, способностью дифференцироваться в нейральном направлении, а также содержит значительно большее количество мультипотентных стволовых клеток по сравнению с пулами МСК, выделенных из других тканей [4].

Таким образом, генетическая стабильность, способность к самоподдержанию и дифференцировке, а также иммуносупрессивное и иммуномодулирующее действие в организме и отсутствие этических проблем для изучения и дальнейшего применения, делают МСК одними из перспективных направлений регенеративной медицины.

1.1.2. Поверхностные антигены МСК

Согласно критериям, установленным Международным обществом клеточной терапии, МСК человека должны экспрессировать на своей поверхности минимальный наборов антигенов – CD73, CD90, CD105, также они должны проявлять отрицательную экспрессию CD34, CD45 и HLA-DR [14]. Помимо этого, МСК из различных источников могут характеризоваться экспрессией множества дополнительных поверхностных молекул, в частности, CD44 и CD117.

Поверхностные антигены МСК по сути являются клеточными рецепторами, вовлеченными в реализацию и регуляцию различных клеточных функций за счет того, что они являются частью сигнальных каскадов, запускаемых молекулами извне. Далее приведена краткая характеристика структурно-функциональных особенностей вышеперечисленных маркеров МСК.

CD73 представляет собой мембранную экто-5'-нуклеотидазу (димер массой 70 кДа), обеспечивающую передачу сигнала за счет дефосфорилирования пуриновых и пиримидиновых рибо- и

дезоксирибонуклеозидмонофосфатов до их соответствующих нуклеозидов, в частности, аденозинмонофосфата (АМФ) до аденозина. В организме человека аденозинергический путь является одним из ключевых в реализации гемостатических и иммуномодулирующих функций МСК. *In vivo* за счет CD73 МСК ингибируют активацию тромбоцитов [19]. В исследованиях состава гетерогенной популяции МСК, выделенной из жировой ткани человека, было показано, что клетки с положительной экспрессией комбинации маркеров ALP+/CD73+ демонстрируют повышенный потенциал остеогенной дифференцировки *in vitro.* Помимо МСК CD73 также экспрессируется на поверхности лимфоцитов, а изменение уровня его экспрессии связано с развитием иммунодефицитных состояний. Отмечается, что экспрессия и функционирование CD73 может повышаться в условиях гипоксии, а также в присутствии провоспалительных медиаторов, TGF-b, IFN, TNF-a, IL-1b и простогландина E2 [20]. CD73 является одним из важнейших маркеров, необходимых для идентификации МСК согласно минимальным критериям Международного общества клеточной терапии [14].

CD90 (Thy-1) - мембранный гликопротеин массой 25-35 кДа, данный поверхностный антиген экспрессируется в организме широким спектром клеток, включая клетки нервной системы, соединительной ткани и различные линии стромальных клеток [21]. Также CD90 является также одним из важнейших маркеров, необходимых для идентификации МСК согласно минимальным критериям Международного общества клеточной терапии [14]. Функция CD90 для МСК до конца не выяснена, однако известно, что снижение его уровня приводит к усилению дифференцировочного потенциала МСК жировой ткани, пульпы зуба и амниотической жидкости в остеогенном и адипогенном направлениях *in vitro* в присутствии индукторов дифференцировки, а также снижению уровня экспрессии CD44 и CD166 и повышению продукции щелочной фосфатазы, при этом изменений кинетики роста клеток и их иммуносупрессивного действия на пролиферацию лимфоцитов периферической крови не наблюдается [21]. Также известно, что

CD90 регулирует активность Rho GTPases («малые» G-белки) в фибробластах, влияя на их адгезию, организацию цитоскелета и миграцию, [22] и, в целом, является важным регулятором передачи сигналов МСК [23].

В исследовании Woeller и соавт. также было показано, что *in vivo* уровень CD90 контролирует процессы адипогенеза [24], а сразу после индукции дифференцировки наблюдается прогрессирующее снижение уровня мРНК CD90 [25]. Однако выявленная в исследовании Moraes DA и соавт. закономерность влияния CD90 также и на остеогенную дифференцировку находит некоторое противоречие, поскольку известно, что стимулы дифференцировки обычно вызывают “обратную зависимость” между реализацией процессов адипогенной и остеогенной дифференцировок [26, 27] (Рисунок 1).

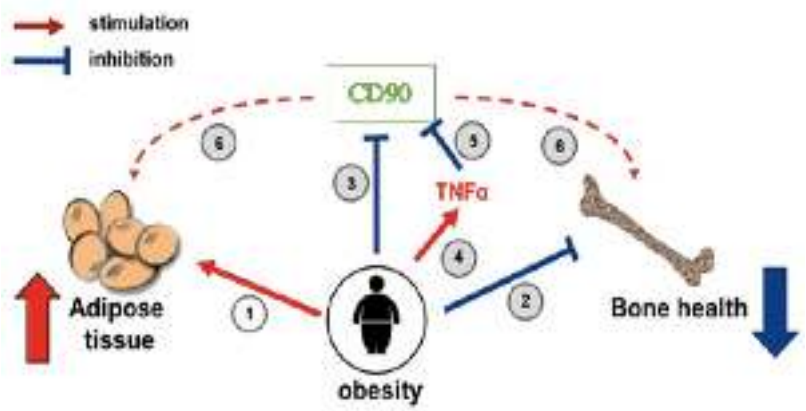


Рисунок 1. Вовлеченность CD90 во взаимосвязь между процессами адипогенной и остеогенной дифференцировок в организме человека [27].

Интересно, что в вопросе влияния CD90 на морфологию МСК также существуют противоречия. С одной стороны, некоторые исследователи указывают на то, что популяция CD90- клеток характеризуется большей полигональностью по сравнению с веретенообразной CD90+ популяцией МСК [28]. С другой стороны, в исследованиях Moraes DA и соавторов данной закономерности выявлено не было.

Таким образом, в вопросе функциональной значимости CD90 для МСК существуют противоречия, которые требуют дальнейшего изучения для понимания истинных причинно-следственных связей наблюдаемых изменений.

CD105 (эндоглин) представляет собой мембранный гликопротеин, это один из рецепторов лигандов суперсемейства трансформирующего фактора роста бета (TGF-β), включая TGF-β1 и TGF -β3, активин A и BMP7 [29]. CD105 также один из важнейших маркеров, необходимых для идентификации МСК согласно минимальным критериям Международного общества клеточной терапии [14].

Молекула CD105 принимает участие в реализации процессов клеточной миграции и реорганизации цитоскелета. Высоким уровнем его экспрессии в организме характеризуются клетки в местах воспаления, сосудах опухоли, а также также клетки, вовлеченные в процессы васкулогенеза в эмбриональный период [30]. Уровень экспрессии CD105 на поверхности МСК тесно связан их функциональной активностью [31, 32]. Для МСК жировой ткани, проявляющих отрицательную экспрессию CD105, показан более высокий дифференцировочный потенциал в адипогенном и остеогенном направлениях, а также более выраженное супрессорное действие на пролиферацию Т-лимфоцитов *in vitro*. При этом МСК CD105- проявляют уровни экспрессии других ПА, способность к колониеобразованию и пролиферативный потенциал, аналогичные для МСК CD105+. Также отмечено, что уровень экспрессии CD105 способен повышаться в CD105+ популяции МСК при добавлении в культуральную среду TGF-β1 [33].

Молекула CD44 является трансмембранным гликопротеином с молекулярной массой 85-200 кДа, имеет несколько изоформ, присутствующих на поверхности клеток различных тканей организма, в частности, МСК. CD44 вовлечен в передачу внешних сигналов к белкам мембранного цитоскелета и ядру клетки, регулируя, таким образом,

процессы миграции, пролиферации, адгезии между клетками и матриксом, а также клеточной дифференцировки и выживаемости [34, 35]. Также этот гликопротеин является рецептором гиалуроновой кислоты [36], которой богато микроокружение стволовых клеток. Было показано, что особая гликоформа CD44, обладающая афинностью к селектинам E и L (HCELL), обеспечивает хоуминг ГСК в костном мозге [37].

Также CD44 был признан маркером стволовых клеток некоторых видов злокачественных новообразований: он играет важную роль в метастазировании и прогрессирования опухолей, в частности, за счет связывания с компонентами внеклеточного матрикса. Снижение уровня экспрессии CD44 в раковых стволовых клетках приводит к их переходу в нераковые стволовые клетки [38].

Некоторые исследователи отмечают взаимосвязь CD44 и CD90, а также указывают на них, как на маркеры раковых стволовых клеток [39]. Кроме того, существуют исследования демонстрирующие, что снижение экспрессии CD90 приводит к снижению экспрессии CD44, что может быть связано со сдвигом их в сторону состояния более восприимчивого к дифференцировке [22].

CD117 (c-Kit) – протонкоген, трансмембранный гликопротеин массой 145 кДа с активностью тирозинкиназы, обеспечивающей клеточный сигналинг за счет переноса фосфатного остатка с АТФ на тирозиновый остаток специфических клеточных белков-мишеней [40]. Экспрессируется на поверхности некоторых типов стволовых клеток, а также клетках микроокружения опухоли, в том числе, мезенхимальных.

Является рецептором фактора роста стволовых клеток (SCFR), играющего важную роль в процессах пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток. Показано, что экспрессия CD117 на поверхности МСК может быть связана с их высоким потенциалом дифференцировки [41, 42] Также CD117 вовлечен в процессы пролиферации, выживаемости и метастазирования клеток рака молочной железы [43], в частности, за счет

его присутствия на поверхности МСК жировой ткани – клетках микроокружения опухоли [40].

1.1.2. Секреторный профиль МСК

Мезенхимальные стромальные клетки способны реализовывать взаимодействия с другими клетками путем прямого межклеточного контакта, а также за счет выделения в окружающую их среду сигнальных молекул – цитокинов. Секреторный профиль цитокинов разнообразен и, в целом, схож по своему составу у МСК из различных источников. Однако в нем могут существовать как качественные, так и количественные различия [44,45].

Секреторный профиль МСК из различных источников может включать в себя следующие цитокины и ростовые факторы: BMP, CCL5/RANTES, EGF, FGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, ICAM, IDO, IGF, IL-10, IL-6, IL-8, LIF, MCP-1, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, PDGF, PGE2, TGF-β, TIMP-1, TIMP-2, VEGF [46].

В организме человека цитокины МСК обладают иммуномодулирующим действием, зачастую иммуносупрессивным. Они вовлечены в сложные разнонаправленные взаимодействия, в которых принимают участие клетки иммунной системы. Важно, что МСК и сами являются объектом цитокиновой регуляции и под действием некоторых факторов могут проявлять свой иммуносупрессивный эффект, и, таким образом, МСК секретируют цитокины спонтанно или после воздействия на них других цитокинов, таких как ИЛ-1в, IFNγ, TNFα [47].

МСК могут оказывать не только иммуносупрессивное действие на иммунную систему. Эффект, оказываемый МСК, определяется состоянием микроокружения, в котором они находятся. Также наличие определенных рецепторов TLR – рецепторов, экспрессируемых МСК, может определять их про- и противовоспалительные эффекты [47]. Таким образом, определение конкретного цитокина, только как про- или противовоспалительного, может быть далеко от реальности, поскольку большинство из них так или иначе вовлечены в оба эти процесса.

Сегодня также существуют исследования, доказывающие, что воздействие радиационного облучения на организм приводит к запуску каскада цитокинов, опосредующих развитие ранних и поздних радиационных повреждений [48]. И поскольку МСК являются важнейшей составляющей организма, способной оказывать иммуномодулирующее действие, понимание изменений, происходящих в их цитокиновом профиле под влиянием облучения малыми дозами радиации – важнейший аспект изучения.

Интерлейкин–6 (ИЛ-6) – многофункциональный белок массой 21-26 кДа (гликозилированная форма), про- и противовоспалительный цитокин, кодируемый геном 7p21 и состоящий из 212 аминокислот. Был открыт в 1986 году, как фактор, стимулирующий В-лимфоциты. Это растворимый медиатор с плеотропным действием на процессы воспаления, иммунного ответа, гемопоэза, апоптоза, пролиферации клеток и их выживаемости, а также онкогенеза. Продуцируется в организме человека в ответ на инфекционное заражение и тканевые повреждения [49]. На начальной стадии воспаления ИЛ–6 синтезируется локально – в зоне поражения, после чего через кровяносное русло он попадает в печень, где происходить быстрая индукция синтеза обширного спектра белков острой фазы, таких как С–реактивный белок, фибриноген и др. Вместе с тем ИЛ-6 стимулирует пролиферацию Т-клеток и играет важную роль в развитии гуморального иммунитета: стимуляции дифференцировки В-клеток и секреции ими антител. Постоянный и неконтролируемый синтез ИЛ–6 приводит к развитию хронического воспаления и аутоиммунных заболеваний [50].

Рецептор ИЛ–6 может существовать в двух изоформах – трансмембранной 80 кДа и растворимой 55 кДа. Растворимая форма не имеет цитоплазматического региона и представлена в человеческой сыворотке. После связывания целевой молекулы ИЛ–6 с растворимой формой рецептора образуется комплекс, который взаимодействует на поверхности клеток с сигнальной цепью gp130 (130 кДа). Широкий диапазон экспрессии gp130 на поверхности клеток обуславливает плеотропное действие ИЛ–6 [51].

Активированный комплекс рецепторов ИЛ–6 представляет собой гексаметрическую структуру, состоящую соответственно из двух молекул ИЛ-6, растворимого рецептора ИЛ–6 и gp130 (Рисунок 2) [52]. Данный комплекс запускает нисходящий сигнальный каскад: (JAK)-STAT3 и JAK-SHP-2 – MAPKs.

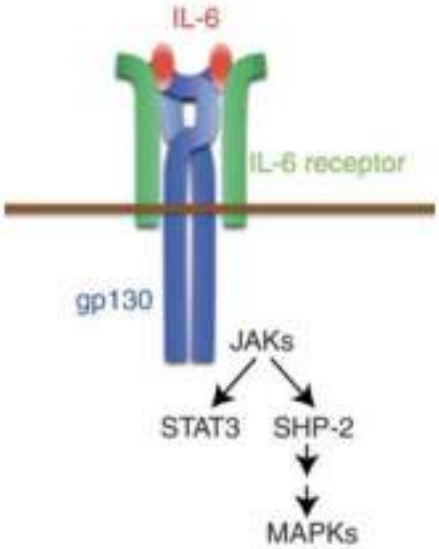


Рисунок 2. Активированный комплекс рецепторов ИЛ–6 [52].

Некоторые авторы считают, что, связываясь с растворимым рецептором, ИЛ–6 оказывает провоспалительный эффект, в то время как классический путь взаимодействия с мембранным рецептором связан с противовоспалительным эффектом [53]. Интересно, что сигнальная молекула gp130 на поверхности клеток также используется такими рецепторами, как LIF, ИЛ–11, ИЛ–27, ИЛ–35, онкостатин М, кардиотрофин 1 и др [54].

Противоспалительный эффект ИЛ-6 может быть как локальным, так и системным и, с одной стороны, он основан на угнетении секреции многих провоспалительных цитокинов: ИЛ–1, TNFα, GM-CSF, IFNγ, а с другой – индукции синтеза глюкокортикоидов, ИЛ–10, антагонистов рецепторов ИЛ–1 и растворимых рецепторов TNFα [50,55].

Множество современных публикаций подтверждает секрецию ИЛ–6 МСК [56,57], причем она детектировалась как спонтанно, так и после индукции следующими факторами: TNFα, ИЛ–1b и IFNγ [47,50]. Было

выдвинуто предположение о главенствующей роли ИЛ–6 в иммунорегуляторных функциях МСК [44], причем они могут быть как источником ИЛ–6, так и его мишенью. Под действием ИЛ–6 МСК могут претерпевать злокачественную трансформацию [58], что вызывает новые вопросы о взаимодействии МСК с микроокружением опухоли, которое обычно очень богато ИЛ–6.

Также ИЛ–6 стимулирует секрецию ИЛ–10 различными типами клеток [55]. Некоторые публикации описывают путь, в ходе которого ИЛ-6, секретируемый МСК, напрямую или через индукцию аутокринной секреции ИЛ–10, влияет на активность моноцитов, ингибируя их дифференцировку в дендритные клетки. Также это сказывается на антигенпрезентирующей способности дендритных клеток и, таким образом, формируется популяция незрелых толерогенных (иммунологически толерантных) дендритных клеток, секретирующих ИЛ–10 [59].

В исследованиях влияния ИИ на продукцию ИЛ-6 было показано повышение экспрессии ИЛ-6 фибробластами, кератиноцитами и эпителиальными клетками человека. В частности, однократное облучение в дозе 5 Гр приводило к повышению экспрессии мРНК ИЛ-6 в культуре фибробластов FH109, как в ранние сроки, так и через шесть часов после облучения. В культуре клеток HeLa было показано, что экспрессия ИЛ-6 дозозависимо повышается при однократном облучении в дозе до 20 Гр [60,61,62].

Промотор ИЛ-6 содержит большое количество сайтов связывания для индуцибельных транскрипционных факторов NF-kB, (AP)-1, AP-2, NF-IL-6 и CREB [63]. Воздействие ИИ индуцирует связывающую активность некоторых их них: NF-kB, AP-1, и CREB, что приводит к активации экспрессии ИЛ-6, при этом после удаления последовательности NF-kB активация промотора ИЛ-6 не наблюдалась. Существует предположение, что активация экспрессии связана с посттрансляционными изменениями ранее существовавших белков NF-kB and AP-1 [61,62].

Было показано, что радиационно-индуцированное повышение экспрессии ИЛ-6 может быть ингибировано в дозо-зависимой манере путем предварительного внесения к эпителиальным клеткам производных кортикостероидов, гидрокортизона, дексаметазона. Это связано с наличием в промоторе ИЛ-6 глюкокортикоид-чувствительных элементов (GRE), располагающихся в области связывания транскрипционных факторов. Таким образом, можно предположить, что связывание комплексов рецепторов кортикостероидов GRE ингибирует распознавание транскрипционных факторов, вовлеченных в активацию промотора ИЛ-6 [64]

Интерлейкин 10 (ИЛ–10) – плеотропный противовоспалительный цитокин, который был описан и охарактеризован в 1980 году. Это димерный белок, состоящий из двух субъединиц, каждая из которых включает в себя 178 аминокислотных остатков. Главная функция ИЛ-10 – индукция иммунной толерантности за счет оказываемого эффекта на антигенпрезентирующие клетки, в частности, дендритные клетки (ДК). Реализуя противовоспалительные свойства, ИЛ–10 также супрессирует функции макрофагов и нейтрофилов, ингибирует Th1 (Т-хэлперы 1) иммунный ответ, влияет на синтез NF-kB (транскрипционный фактор, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа), а также стимулирует экспрессию противовоспалительных молекул таких, как ингибиторы протеаз, IL-1 и антагонисты TNFα [50,65,66]. Помимо этого, IL-10 супрессирует секрецию провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) дентритными клетками, а также экспрессию ими на поверхности молекул MHC II наряду с ко-стимулирующим комплексом B7 [66].

ИЛ-10 секретируется главным образом моноцитами, а также макрофагами, Т и В – лимфоцитами, NK-клетками и нейтрофилами [67]. Также его (и некоторых других цитокинов) важной особенностью является то, что продуцирующие их клетки одновременно являются и источником, и мишенью цитокинового эффекта (аутокринная петля), подобная ситуация хорошо описана для ДК и Т-регуляторных клеток [65].

Эффект ИЛ-10 опосредован через его специфический рецептор IL-10R, состоящего из двух субъединиц: IL-10RA и IL-10RB и запускающего общий для большинства других цитокинов каскад JAK1 и STAT-3 [66].

Проведенные на сегодняшний день исследования разделяются во мнении относительно того секретируют ли МСК ИЛ-10: часть из них отрицает такую возможность [44,56], часть – подтверждает [47, 57]. Предположительно это связано с воспалительным характером их микроокружения, а также присутствием в среде таких цитокинов, как IFNγ, IL-1b, TNFα, которые активируют определенные TLR на поверхности МСК [68]. До сих пор точная причина синтеза ИЛ-10 МСК не известна, однако его роль в непрямой стимуляции секреции ИЛ-10 другими клетками бесспорна. Следует отметить, что МСК выделяют и другие факторы, стимулирующие выделение ИЛ-10 мононуклеарами периферической крови, толерогенными макрофагами и дендритными клетками [59].

Семейство белков фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) – это ключевые медиаторы процессов васкулогенеза (образование эмбриональной сосудистой системы) и ангиогенеза, играющих важную роль в процессах развития опухоли, а также острого и хронического воспаления. Всего в семействе факторов роста эндотелия сосудов описано 6 белков: VEGF-A, -B, -C, -D, -E и PlGF (плацентарный фактор роста). Белки проявляют себя как митогены, вовлеченные в процессы выживания, пролиферации, миграции и дифференцировки эндотелиальных клеток сосудов, а также способствуют увеличению проницаемости микрососудов. Помимо этого, белки VEGF участвуют в реализации процессов воспаления, например, за счет повышения секреции IDO дендритными клетками, а также иммуносупресивного влияния на активацию и пролиферацию лимфоцитов [69]. Таким образом, помимо клеток эндотелия сосудов VEGF-A оказывает влияние на некоторые другие клетки, взаимодействуя с 2 рецепторами, экпрессируемыми на их поверхности: VEGF-R1 и VEGF-R2.

Белок VEGF-A, секретируемый опухолевыми клетками, вовлечен в процессы иммуносупресии за счет down-регуляции транскрипционного фактора NF-kB, приводящей к ингибированию созревания и антигенпрезентирующей функции дендритных клеток [70]. Повышенный уровень VEGF в плазме крови коррелирует с наличием незрелых дендритных миелоидных клеток в периферической крови [71]. Существуют исследования, доказывающие, что лечение антителами к VEGF повышает количество и усиливает функции дендритных клеток. Также VEGF-A снижает количество Т-клеток селезенки и супрессирует их функцию [72].

В свою очередь МСК – мощный источник VEGF. Высокие уровни экспрессии сохраняются в течение длительного периода культивирования *in vitro* [73]. Существует предположение, что условия гипоксии, а также взаимодействие с TNFα стимулируют МСК к высвобождению VEGF за счет STAT3 и p38 MAPK зависимых механизмов [74].

Индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO) – фермент, катаболизирующий триптофан, обладающий иммунносупрессивным и антимикробным действием. Это один из ключевых иммунномодуляторов, секретируемых МСК, а также клетками опухоли и во время беременности. Секреция IDO имеет видовую специфичность, например, мышиные МСК секретируют его в очень небольших количествах, в то время как МСК человека, свиньи и обезьян секретируют его в достаточном, а МСК крыс, хомяков, лошадей, кроликов не продуцируют IDO вовсе [75]. В организме человека IDO секретируется различными типами МСК: децидуальными, МСК околоплодных вод, МСК пупочного канатика и жировой ткани [76, 77, 78].

Не активированные МСК экспрессируют низкие уровни IDO, однако после стимуляции клеток IFNγ детектируются высокие уровни мРНК IDO. Повышение секреции IDO МСК приводит к аресту клеточного цикла и апоптозу В-клеток иммунной системы, в то время как не активированные МСК поддерживают их пролиферацию и выживаемость [79]. Помимо этого, благодаря IDO, МСК подавляют созревание и функции дендритных клеток

[80]. Также к повышению экспрессии IDO и восстановлению его синтеза в МСК в отдаленные сроки культивирования приводит применение глюкокортикостероидов [81]. Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями (DAMPs) также вовлечены в процессы экспрессии IDO МСК [82].

Ингибирование IDO положительно сказывается на пролиферативной активности Т-клеток [83]. Данное явление лимитирует иммуносупрессивное действие МСК [84]. Напротив же, катаболическая активность IDO приводит к супрессии пролиферации Т-клеток за счет быстрой деградации триптофана [85].

Интерлейкин – 8 (ИЛ-8, CXCL8) – один из членов семейства хемокинов, структурно родственных молекул относительно небольшой массы 7,5-12,5 кДа с хемоаттрактантными свойствами [86]. Продукция ИЛ-8 требует процессинга белка-предшественника специфическими протеазами, в частности, катепсином L. Зрелая молекула ИЛ-8 характеризуется наличием четырех консервативных остатков цистеина, вовлеченных в образование дисульфидных мостиков. На поверхности клеток ИЛ-8 связывается с рецепторами CXCR1 и CXCR2, которые являются членами семейства рецептором, сопряженных с G-белком (GPCR) и экспрессируются на поверхности различных типов клеток [87].

Роль хемокинов в организме заключается в регуляции процессов воспаления, клеточной дифференцировки и миграции иммунных клеток, а также ангиогенеза [88]. Они продуцируются и секретируются различными типами клеток: мононуклеарными фагоцитами, эндотелиальными и эпителиальными клетками, а также фибробластами, кератиноцитами, Т-лимфоцитами, эозинофилами, нейтрофилами и меланоцитами в ответ на про-воспалительную стимуляцию (липополисахариды IL-1 и TNF-a, ИИ, вирусные инфекции, фитогемагглютинин, двунитевая РНК) с целью привлечения к местам инфицирования и активации нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и других эффекторных клеток [86].

Было установлено, что *in vitro* МСК секретируют множество различных хемокинов, в том числе ИЛ-8. Профиль секретируемых цитокинов МСК во много зависит от их микроокружения и контактов с другими клетками, особенно клетками иммунной системы. Целевыми клеткам для воздействия хемокинов МСК являются нейтрофилы, моноциты, эозинофилы, базофилы, Т и В – лимфоциты, ДК, NK-клетки гемопоэтические и эндотелиальные предшественники [89].

В целом, можно сказать, что хемокины МСК реализовывают свою иммуномодулирующие свойства за счет хемоаттрактантного действия – привлечения клеток к местам развития воспалительных реакций. В общем процессе иммуномодуляции *in vivo* этот эффект крайне важен, поскольку привлечение иммунных клеток к местам в непосредственной близости от МСК позволяет реализовывать прямые межклеточные взаимодействия за счет других факторов, вырабатываемых МСК, осуществляя тем самым паракринную иммунорегуляцию [90].

Воздействие ИИ в дозе 6 Гр в культуре первичных кератиноцитов приводило к индукции экспрессии ИЛ-8 через 3 часа после облучения. Снижение уровня мРНК ИЛ-8 отмечалось через 10 и 24 часа и возвращалось к базовым значениям уже через 48 часов после облучения [91]. В культуре фибробластов легкого (HFL1) облучение малыми дозами (3,6–19 сГр) приводило к повышению уровня продукции белка ИЛ-8 начиная уже с 30 минуты после воздействия. Повышению уровня белка соответствовало повышение уровням мРНК ИЛ-8 [92]. Также в масштабном исследовании экспрессии генов на модели фибробластов (HFLIII) было показано, что через час после облучения малыми дозами ИИ (1 сГр) экспрессия мРНК ИЛ-8 в клетках повышалась, также и экспрессия других членов семейства: GRO-a (CXCL1), GRO-b (CXCL2) и GCP-2 (CXCL6) [93]. Интересно, что повышение уровня ИЛ-8 ингибировалось предварительной обработкой фибробластов дексаметазоном [92]. Промотор ИЛ-8 содержит сайты связывания для транскрипционных факторов NF-kB и AP-1 [94]. Вероятно, радиационно-

индуцируемая активация NF-kB и AP-1 – механизм, лежащий в основе эффектов ИИ на экспрессию кератиноцитами ИЛ-8.

1.2. Радиочувствительность стволовых клеток

Процесс облучения клеток – это в первую очередь биофизическое взаимодействие между излучением (частицами или волнами) и клетками, которое приводит к ионизации атомов и, как следствие, повреждениям молекул, входящих в состав клеточных органелл и вовлеченных важнейшие процессы жизнедеятельности. Вторичным является образование свободных радикалов – активных форм кислорода и азота, также приводящим к повреждению молекул ДНК, белков и липидных мембран клетки. Описанные процессы способны вызвать клеточную гибель путем апоптоза, митотической катастрофы, некроза или аутофагии, а также могут способствовать возникновению в клетках хромосомных аберраций и повышению частоты клеточных мутаций и, как следствие для организма в целом – воспалению, преждевременному старению и канцерогенезу [95].

Однако в клетках существуют защитные механизмы, способные компенсировать или устранить образовавшиеся повреждения, главным образом ДНК, препятствуя развитию нежелательных явлений. В зависимости от фазы клеточного цикла, посттрансляционных модификаций сигнальных каскадов и изменений конфигураций хроматина процесс облучения может привести либо к гибели клетки, либо к репарации образовавшихся в ней повреждений [96]. В случае если повреждения молекул существенны и необратимы, клетка отвечает на облучение арестом клеточного цикла, апоптозом, старением или трансформацией. Если же разрыв связей в ДНК не был столь серьезным и непоправимым, клетка вступает на путь репарации возникнувших повреждений.

Репарация двунитевых разрывов ДНК осуществляется в клетке двумя главными путями: путем гомологичной рекомбинации, который осуществляется только в S и G2/M фазах клеточного цикла при наличии

сестринских гомологичных хроматид, и путем негомологичного соединения концов, который осуществляется в большинстве случаев в пререпликативной G1 фазе клеточного цикла. Это наиболее важный путь репликации в дифференцированных клетках в терминальной фазе роста [96]. Существуют также менее распространенные механизмы репарации – восстановление несоответствия ДНК (MMR), репарация одноцепочечных разрывов ДНК (SSBR), эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NER).

Следует учитывать, что в зависимости от типа, возраста, степени дифференцированности и выполняемых функций клетки могут обладать различной восприимчивостью к воздействию ионизирующего излучения, т.е. радиочувствительностью. Согласно закономерности: чем менее дифференцирована клетка, тем более она радиочувствительна, стволовые клетки характеризуются большей радиочувствительностью в сравнении с другими типами клеток организма. Существуют исследования, доказывающие, что при наличии повреждений ДНК стволовые клетки в большей степени подтверждены вступать в апоптоз, нежели запускать механизмы репарации [97].

Однако и среди стволовых клеток существуют различия в их радиочувствительности. Показано, что реакция стволовых клеток взрослого организма на радиационные повреждения отлична от реакции эмбриональных стволовых клеток. Воздействие ИИ на эмбриональные стволовые клетки стимулирует их вступление в апоптоз, тогда как стволовые клетки взрослого организма проявляют широкий спектр различных вариантов защиты от радиационного поражения [98]. Данное явление может быть связано с тем, в какой фазе клеточного цикла находятся облучаемые клетки – в состоянии покоя или пролиферации, также влияние могут оказывать эпигенетические изменения и разница в микроокружении стволовых клеток, находящихся в различных нишах, каждая из которых характеризуется определённым составом тканеспецифичных факторов,

необходимых для поддержания их жизнедеятельности. Например, известно, что часть стволовых клеток взрослого организма человека находится в состоянии покоя – в G0-фазе клеточного цикла. Данное состояние важно для длительного сохранения пролиферативного потенциала и генетической стабильности стволовых клеток, в процесс его поддержания вовлечено множество факторов. При воздействии ИИ на клетки в состоянии покоя, возникающие повреждения ДНК не запускают пути репарации, поскольку клетки не проходят соответствующие сверочные точки клеточного цикла (чек-поинты). Таким образом, стабильность клеточного генома не поддерживается в полной мере и, в случае отсутствия дополнительных защитных механизмов, клетки вынуждены вступать в апоптоз [99].

Существуют исследования, доказывающие, что МСК относительно более устойчивы к повреждающему действию ИИ. Вероятно, это связано с тем, что МСК способны компенсировать негативные последствия воздействия ИИ за счет реализации реакций на возникшие повреждения, таких, как ферментативная активность ATM-белка, активация сверочных точек клеточного цикла, репарация двунитевых разрывов ДНК [100]. Также глобально более открытая и благоприятная для экспрессии генов ядерная организация генетического материала в МСК облегчает процесс остановки клеточного цикла и репарации ДНК в поврежденных клетках [101].

В исследованиях радиочувствительности МСК было установлено, что при их облучении в дозе до 20 Гр индукция клеточного апоптоза минимальна, при этом клетки демонстрируют высокие уровни экспрессии антиапоптотических протеинов BCL-2 и BCL-XL, а также низкие уровни проапоптотических протеинов таких, как PUMA [102]. Также через короткий промежуток времени после облучения ИИ в МСК были показаны высокие уровни фосфорилированного белка-гистона H2AX, как маркера процессов репарации двунитевых разрывов ДНК [103]. В то же время другие исследования демонстрировали высокую экспрессию данного белка только через 3 дня после облучения, что может указывать на возможную

преждевременную активацию программ старения в клетках. Выдвинуто предположение, что после длительного и острого облучения рентгеновским излучением, МСК по-разному накапливают фокусы γ-H2AX и 53BP1 [104].

Интересные результаты были получены в исследовании Wu и соавт. Было показано, что облучение по-разному влияет на МСК ранних и поздних пассажей. В течение 72 часов после облучения происходит снижение тенденции задержки как ранних, так и поздних МСК в G0/G1 фазе клеточного цикла, а также существенное накопление ранних МСК в фазе G2/M. Из этого следует, что МСК раннего пассажа обладают более эффективными сверочными точкам в G2/M фазе клеточного цикла и, вероятно, что репарация ДНК в них происходит за счет механизма гомологичной рекомбинации – наиболее эффективного и безошибочного способа репарации. Напротив, учитывая то, что большинство МСК позднего пассажа после облучения все же находились в G0/G1 фазе клеточного цикла для них наиболее вероятен способ репарации, для которого в большей степени характерно возникновение ошибок – механизм негомологичного соединения концов, способный приводить к большему числу геномных изменений [105]. Таким образом, возраст и стадии клеточного цикла играют важную роль в радиочувствительности стволовых клеток.

Существуют также эпигенетические процессы, вовлеченные в процессы, обуславливающие радиочувствительность стволовых клеток. Эпигенетические изменения включают в себя метилирование ДНК, ацетилирование гистонов и регуляцию экспрессии генов за счет микроРНК. Предполагается, что эпигенетическое регулирование вносит свой вклад в патогенез радиационно-индуцированного канцерогенеза за счет реактивация онкогенов и инактивации онкосупрессоров [106].

Так, в недавних исследованиях, посвященных модификациям гистонов, был сделан вывод, что ацетилирование и метилирование различных участков гистона H3 может играть существенную роль в радиочувствительности стволовых клеток. Деацетилирование и последующее триметилирование

H3K9 обеспечивают повышение радиорезистентности стволовых клеток: снижают частоту развития радиационно-индуцированного апоптоза, а также индуцируют ответ на повреждение ДНК, в частности, за счет регуляции активации ATM-белка в ответ на возникновение двунитевых разрывов ДНК [107]. Также известно, что гипометилирование ДНК коррелирует с повышением радиочувствительности клеток. Исследования *de novo* показали, что метилтрансферазы DNMT3A и DNMT3B играют роль в модулировании чувствительности к рентгеновскому облучению, поскольку их удаление оказывало умеренный радиопротекторный эффект [108].

Таким образом, одним из главных предположений, почему находящиеся в одной нише стволовые и не стволовые клетки демонстрируют различную радиочувствительность, являются различия в их ответе на возникающие повреждения ДНК, обусловленные в свою очередь стадией клеточного цикла, эпигенетическими изменениями и активностью некоторых регуляторных белков и ферментов.

1.3. Эффекты малых доз радиации

Сегодня результаты некоторых исследований демонстрируют возможную правомерность пороговой радиационной концепции, указывающей на нелинейную зависимость эффектов от полученной дозы облучения. Также облучение в малых дозах может приводить к развитию таких явлений, как гормезис, адаптивный ответ, радиорезистентность, генетическая нестабильность, эффект свидетеля в клетках, тканях, органах и организме в целом [5,6]. Безусловно, что на реализацию всех описанных реакций влияет генетический фон организма. Также все они взаимосвязаны, и, зачастую, в их основе лежат общие пути передачи сигнала, некоторые из которых (ATM, MAPK, ERK) могут приводить к развитию, как позитивных реакций – высокоточной репарации ДНК, дезактивации активных форм кислорода, усилению врожденного иммунитета, пролиферация МСК, так и негативных – геномной нестабильности [109]. Таким образом, в проводимых

исследованиях, как *in vivo*, так и *in vitro*, в данной области зачастую возникают противоречия, поэтому остается еще очень много вопросов о лежащих в основе данных явлений закономерностях.

1.3.1. Двунитевые разрывы ДНК

Двунитевые разрывы ДНК – один из важнейших критериев оценки влияния ИИ на клетки, поскольку каждый двунитевой разрыв теоретически может привести к клеточной трансформации. Образование двунитевых разрывов ДНК, оцениваемых по количеству фокусов γH2AX и 53BP1 в ядре клетки, происходит под влиянием как больших, так и малых доз радиации, а также других повреждающих факторов, в частности, 3H-тимидина и оксида трития [110, 111].

На модели МСК слизистой ткани десны человека показано, что количество фокусов γH2AX и pATM (киназа, фосфорилирующая H2AX в случае возникновения радиационно-индуцированного двунитевого разрыва ДНК) после воздействия рентгеновского излучения пропорционально полученной дозе облучения, при этом скорость репарации образовавшихся двунитевых разрывов ДНК также пропорциональна полученной дозе [4].

В случае облучения клеток малыми дозами ИИ (до 100 мГр) остаточные фокусы γH2AX длительное время детектируются в ядре клетки (до 250 мин). Авторы исследования указывают, что это может быть связано не столько с плохой репарацией двунитевых разрывов, сколько с нарушением метаболизма клетки и возникновением данных разрывов *de novo,* например, в результате коллапса репликативных вилок, а их восстановление возможно путем гомологичной рекомбинации – наиболее точного и длительного процесса репарации двунитевых разрывов. В пользу теории о нерадиационно-индуцируемой природе остаточных фокусов γH2AX свидетельствует тот факт, что они не ко-локализованы с pATM и наблюдаются преимущественно в пролиферирующих клетках Ki67+ [4, 112]. К тому же в наиболее отдаленные сроки культивирования (11 пассажей после

облучения) у потомков МСК, облученных малыми дозами рентгеновского излучения, остаточные фокусы γH2AX не детектируются, в отличие от потомков МСК, облученных в дозе 1000 мГр, которые к тому проявляют себя как не пролиферирующие (Ki-67-) и стареющие (SA-β-gal+) клетки [112].

В исследовании влияния острого (30 мГр/мин) и хронического (0,1 мГр/мин) гамма-излучения на МСК было показано, что при остром облучении накопление двунитевых разрывов, а также совместно локализованных фокусов γH2AX/pATM, имеет линейных дозозависимый характер, а при хроническом – нелинейный, указывая на существование порогового значения [113]. Острое рентгеновское облучение МСК (90 мГр/мин) также демонстрирует линейную зависимость количества двунитевых разрывов ДНК от дозы (фокусы γH2AX и 53BP1), в свою очередь хроническое (4,5 мГр/мин) – кривую доза-реакция, имеющую начальный линейный участок, за которым следует плато, также указывая на существование пороговой величины. Важно, что после облучения в пролиферирующих и покоящихся клетках нет различий в количестве фокусов γH2AX, однако очаги Rad51 (фокус гомологичной рекомбинации) были обнаружены именно в пролиферирующих клетках, подвергнутых хроническому облучению. Вероятно, что хроническое облучение приводит к увеличению количества клеток S/G2 фазах клеточного цикла, тем самым увеличивая вероятность гомологичной рекомбинации при образовании двунитевого разрыва ДНК [104].

1.3.2. Радиационный гормезис

Гормезис – явление позитивного отклика системы на воздействие малых доз раздражителя, который в больших дозах оказывает негативный эффект [5,109]. Явление радиационного гормезиса находит подтверждение как в эпидемиологических исследованиях, так и в исследованиях на животных и культурах клеток.

В эпидемиологическом исследовании 1980 года в Китае было показано, что уровень смертности от онкологических заболеваний среди людей в возрасте 40 – 70 лет был ниже в группе лиц, проживающих в регионе с высоким средним уровнем фоновой радиации– 2,31 мЗв/год, в сравнении с более низким уровнем – 0,96 мЗв/год. Исследователь Mineetal (1990) показал значительное снижение уровня смертности от нераковых заболеваний среди 290 мужчин (Nagasaki University School of Medicine), облученных в диапазоне доз 500-1490 мГр, в сравнении с необлученной группой мужчин того же возраста. В тоже время для лиц, облученных в дозе меньше 500 мГр, исследователи Katoetal и соавт. (1987) не смогли продемонстрировать существование радиационного гормезиса (Atomic Bomb Casualty Commission – The Radiation Effects Research Foundation cohort). В Тайване Hwangetal (2006) в исследовании местного населения, подвергнувшегося влиянию малых доз радиации в течение 19 лет, показал, что пролонгированное воздействие малых доз радиации способно повышать риск развития некоторых видов рака в определенных подгруппах исследованной популяции. Однако в Китае Taoetal. (2012) указал, что кумулятивная малая доза радиации в районе высокого радиационного фона (округ Янцзян) не была связана с уровнем смертности от онкологии или других не онкологических заболеваний среди местного населения [109]. Возможно, противоречивость результатов представленных исследований обоснована различными типами облучения и мощностями получаемых доз радиации.

В исследованиях на животных неоднократно было показано, что влияние малых доз радиации приводит к усилению иммунитета. Например, облучение мышей в дозе 75 мГр приводило к активации лимфоцитов за счет усиления сигналинга от антигенпрезентирующих клеток: повышения экспрессии поверхностных молекул CD48, CD80, CD86, а также уровня ИЛ-12 и ИЛ-1в, рецептора TNFα, в тоже время снижения соотношения cAMP/cGMP и подавления активации сигнального пути PLA2-PGE2 (фосфолипаза А2-простогландин Е2) [114].

В клетках облучение малыми дозами радиации может приводить к детоксикации активных форм кислорода, высокоточной репарации повреждений ДНК, защите от спонтанных мутаций, происходящих *in vivo*, а также спонтанных неоплатических трансформаций *in vitro* [109]. Помимо этого, в исследованиях на клеточных культурах *in vitro* было показано, что облучение малыми дозами радиации приводит к усилению пролиферативной активности и повышению уровня синтеза белка. В частности, облучение в дозе 75мГр приводило к усилению пролиферативной активности МСК и увеличению количества клеток в S-фазе клеточного цикла, причем в данный процесс был вовлечен сигнальный каскад MAPK/ERK [115]. В тоже время облучение фибробластов линии 3T3 малыми дозами радиации приводило к усилению пролиферации через 3 дня после облучения, однако, количество клеток в S/G2 фазах клеточного цикла статистически достоверно оставалось ниже, чем в контрольной необлученной группе клеток. Данное явление настораживает и может свидетельствовать о не выявленных поломках в процессах деления клеток, которые приводят к нарушению прохождения ими фаз клеточного цикла, а также о неочевидных механизмах регуляции клеточного деления. Интересно также, что в ранние сроки после облучения малыми дозами ИИ может наблюдаться снижение интенсивности пролиферации, а также задержка клеток в G0/G1 фазе клеточного цикла. Данное явление обусловлено классическим механизмом активации чек-поинтов клеточного цикла для минимизации процессов повреждения ДНК, наиболее вероятных в S/G2-фазах, когда ядерная оболочка разрушена [116].

Уровень концентрации белка в клетках согласуется с интенсивностью пролиферативной активности и фазой клеточного цикла: в ранние сроки после облучения содержание общего белка снижается, однако уже к 4 дню после облучения превосходит уровень белка контрольной необлученной группы клеток, при этом количество облученных клеток, находящихся в G0/G1 фазах клеточного цикла, также было выше в сравнении с контрольной группой [116].

Эпигенетические изменения также играют важную роль в реализации процессов радиационного гормезиса. Так, в клеточной культуре было обнаружено повышение уровня метилирования ДНК после облучения малыми дозами радиации 7-76 мГр, причем наиболее ярко этот процесс был выражен у представителей мужского пола [117].

Таким образом, радиационный гормезис – сложный, многокомпонентный процесс, реализация которого во многом зависит от возраста, пола, генетического фона, общего состояния здоровья, типа оказываемого воздействия. Сегодня, установка пределов радиационного воздействия – сложнейшая задача общественного здравоохранения, поскольку эффекты малых доз радиации до сих пор остаются непредсказуемыми.

1.3.3. Адаптивный ответ

Адаптивный ответ заключается в приобретенной устойчивости к облучению большими дозами радиации после предварительного облучения малыми дозами (ниже 100 мГр) [5, 109]. Предполагается, что в основе адаптивного ответа лежат радиационно-индуцированные механизмы репарации, поскольку во многом данный процесс зависит от синтеза белков, вовлеченных в ответ на повреждение ДНК.

Марганецзависимая супероксиддисмутаза (SOD2) – один из ключевых противоапоптотических компонентов адаптивного ответа, уменьшающий количество токсичного супероксида, образующегося в результате действия радиации: две молекулы супероксидного аниона превращаются в воду и перекись водорода, далее перекись может быть дополнительно окислена до воды. Таким образом, SOD2 защищает митохондрии клетки от повреждений свободными радикалами, приводящих к апоптозу. Значительное повышение ферментативной активности SOD2 было зафиксировано в клеточной линии кератиноцитов человека (HK18) после дозы облучения 100 мГр. Наблюдалось также увеличение количества белков, с которыми SOD2

взаимодействует внутри клеток после воздействия малых доз радиации. Эти белки связаны с регуляцией клеточного цикла, репарацией ДНК, регуляцией апоптоза и функцией митохондрий. Также, в адаптивном ответе важную роль играет TNFα-опосредованная сигнализация, поскольку она влияет на ядерный транскрипционный фактор NF-kB, который в свою очередь опосредует тиол-индуцированный адаптивный ответ, приводящий к повышенной экспрессии гена SOD2 [118].

Помимо этого, в реализацию адаптивного ответа вовлечен белок p53. На модели животных было показано, что адаптивный ответ связан с подавлением p53-опосредованного апоптоза. Также существуют исследования, указывающие на роль в реализации адаптивного ответа белков теплового шока, оксида азота и окисленной внеклеточной ДНК [109].

1.3.4. Радиочувствительность и радиорезистентность

Интересно, что в диапазоне малых доз радиации при однократном облучении также могут иметь место дозозависимые эффекты: радиочувствительность и радиорезистентность. Клетки, изначально чувствительные к облучению, с повышением дозы становятся устойчивыми к повреждающему действию радиации [109].

В исследованиях на клеточных культурах было показано, что реакция радиочувствительности развивается после облучения малыми дозами радиации в диапазоне до 100 мГр. При увеличении дозы радиации до 300 мГр происходит постепенное увеличение радиорезистентности клеток, вплоть до 1000 мГр, когда радиорезистентность становится максимальной. Механизмы восстановления потенциально летальных повреждений считаются наиболее важными в реализации реакции радиорезистентности, в частности, опухолевые клетки человека могут обладать повышенной способностью к восстановлению подобных повреждений [119]. Также было показано, что именно однонетевые, а не двунитевые разрывы ДНК, образовавшиеся в ходе облучения, являются наиболее важными индукторами

радиорезистентности в клетке. Особенно сильными индукторами данного ответа явились повреждения ДНК, вызванные гидроксильными радикалами, образовавшимися в ходе радиолиза молекул воды [120].

1.3.5. Геномная нестабильность

Облучение малыми дозами радиации может приводит к развитию геномной нестабильности – явлению, характеризующемуся высокой частотой появления изменений в геноме млекопитающих: кариотипические аномалии, мутации и амплификация генов, клеточная трансформация, клональная гетерогенность и замедленная гибель репродуктивных клеток в потомстве облученных клеток [121]. Впервые это явление было описано в 1989 году в культуре облученных фетальных клеток мышей. Генетическая нестабильность появлялась в виде отсроченного начала появления *de novo* хромосомных аберраций и микроядер в клетках [122]. Сегодня геномная нестабильность общепризнана, как один из важнейших аспектов канцерогенеза. Уровень геномной нестабильности зависит от самого генотипа облучаемого организма, типа применяемого излучения, типа облучаемых клеток и тканей, однако до сих пор не удалось установить четкие основополагающие закономерности развития данного явления [123].

Безусловно, что ядро клетки считается главной мишенью для индукции геномной нестабильности. Вклад в реализацию процесса вносят белки, участвующие в репарации ДНК, например, ДНК-зависимая протеинкиназа, а также белок p53 [124]. Кроме этого, критическую роль в потере стабильности генома могут играть эпигенетические факторы – изменения в паттернах метилирования, ацетилирования и фосфорилирования [125], а также нарушения метаболизма митохондрий и статуса АФК [126]. Предположительно повышенная экспрессия протеинкиназ MAPK Raf-1, MEK-1 и ERK-1/2 и изменения теломерных участков хромосом также могут влиять на стабильность генома клетки [109].

В исследовании микроядер и оксидативного стресса после воздействия острого и хронического рентгеновского облучения Elbakrawy и соавт. было показано, что радиационно-индуцированная геномная нестабильность наблюдается у потомков фибробластов как после облучения малой дозой 0,1 мГр, так и средней дозой 1 мГр. Авторы исследования предполагают, что воздействие ИИ нарушает гомеостаз окислительного стресса в клетках и, таким образом, приводит к усилению индукции эндогенного повреждения ДНК [127].

Существуют исследования, доказывающие, что секретируемая форма кластерина (sCLU) – белка шаперона, вовлеченного в регуляцию процессов апоптоза, также вовлечена в процессы поддержания и развития геномной нестабильности. Секретируемый после воздействия малых доз радиации белок способен изменять процессы внутриклеточной коммуникации благодаря своей способности связывать поверхностные клеточные рецепторы, в частности, TGF-β – рецепторы (типы I и II) [128].

В исследовании Mooreetal и соавт. было показано, что геномная нестабильность снижалась на 60% в клеточных культурах, облученных после добавления к ним антител к TNFα [129]. Можно предположить, что данный фактор также играет важную роль в инициации процесса геномной нестабильности.

Очевидно, что геномная нестабильность, также как и радиационный гормезис, и адаптивный ответ – сложный, многокомпонентный и многостадийный процесс, требующий дальнейшего изучения, поскольку именно он может лежать в основе развития отсроченных эффектов облучения малыми дозами радиации.

1.3.6. Эффект свидетеля

Радиационно-индуцированный эффект свидетеля – немишенный эффект радиации, феномен, в результате которого в необлученных клетках

развиваются эффекты облучения за счет передачи им сигналов от соседних клеток, подвергнутых действию радиации.

Сегодня множество исследований посвящено поиску путей сигнализации, вовлеченных в реализацию эффекта свидетеля. Известно, что гибель клеток, вызванная радиационным воздействием, стимулирует ответную реакцию иммунной системы за счет секреции ими DAMPs, которые в свою очередь распознаются рецепторами PRRs на поверхности иммунных клеток. TLR2, TLR4 и TLR9 – одних из самых известных рецепторов PRRs, вовлеченных в этот процесс. DAMPs, связавшиеся с TLR, повышают в клетке иммунной системы экспрессию транскрипционных факторов NF-kB, STAT-1, STAT-3 и SMAD2, что в свою очередь приводит к секреции ими различных цитокинов: ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-33, TGF-b, TNF-a, IFN-гамма [130]. Передача сигналов от облученных к необлученным (не иммунным) клеткам (клеткам-свидетелям) ткани также осуществляется за счет выделения ими различных факторов, образованных после непосредственного воздействия на клетки ИИ, приводящего к повреждениям молекул, мембран и целых органелл. Секреторные факторы могут высвобождаться клетками самостоятельно или в составе экзосом.

Под влиянием факторов, выделяемых облученными клетками, клетки-свидетели претерпевают изменения, способные приводить к развитию радиационного канцерогенеза, в частности, эпигенетические изменения – гипометилирование, а также снижение/повышение уровня некоторых типов микроРНК [131]. Помимо этого, в клетках-свидетелях повышается уровень двунитевых разрывов ДНК и активных форм кислорода (АФК), а также некоторых воспалительных цитокинов, продукция которых также связана с образованием в клетках АФК и оксида азота (NO-), способных, в свою очередь, приводить к хромосомным аберрациям и геномной нестабильности клетки [132], влекущим за собой канцерогенез. Известно, что в процесс продукции АФК клетками-свидетелями вовлечён сигнальный каскад NF-B и

рецептор TLR9, способный связываться с экзосомами и окисленными формами ДНК в окружающей клетку среде [133].

Сегодня все большее количество исследований посвящено изучению вовлеченности экзосом в передачу межклеточного сигнала. Данное направление интересно, поскольку экзосомы – это микро- или нановезикулы, содержащие белки, мРНК, микроРНК и фрагменты ДНК, заключенные в липидную оболочку, по своему антигенному составу близкую к плазматической мембране клетки, высвободившей секрет. Экзосомы способны передавать межклеточные сигналы на большие расстояния, мигрируя по всему организму и не подвергаясь деструкции, сохраняя комплекс заключенных в них сигнальных молекул [134].

Считается, что экзосомы вовлечены в реализацию эффекта свидетеля за счет стимуляции клеток иммунной системы (В-клетки и дендритные клетки), а также прямого слияния с плазматической мембраной клеток-свидетелей. Попадая в клетку, компоненты экзосом оказывают комплексное воздействие на реализацию эффекта свидетеля. Одни из наиболее важных эффектов экзосом – выработка АФК (нарушение кальциевой сигнализации [135]) и повреждение ДНК. Также за счет содержащихся в экзосомах молекул микроРНК в клетках-свидетелях могут происходить эпигенетические изменения, вовлеченные в реализацию эффекта свидетеля [136].

Безусловно, эффект, оказываемый экзосомами на клетки-свидетели, зависит от их состава, который в свою очередь зависит от типа клеток, высвободивших экзосомы. Ионизирующее излучение влияет на состав секретируемых экзосом, а также стимулирует клетки к их высвобождению [134]. Помимо этого, количество экзосом может зависеть от полученной дозы облучения [135].

Наряду с экзосомами в процесс передачи межклеточного сигнала и реализацию эффекта свидетеля вовлечены цитокины, окисленные формы ДНК, самостоятельные молекулы микроРНК, протеинкиназы, например,

митоген-активированные протеинкиназы (MAPKs), протеинкиназа B и протеинкиназа C [134].

Окисленные формы ДНК – это фрагменты молекулы ДНК, образовавшиеся в результате воздействия свободных радикалов или редокс-опосредованных окислительных путей на генетический материал клетки, как в ядре, так и в митохондриях, после облучения ИИ. Окисление ДНК наряду с некрозом и апоптозом клеток может приводить к развитию воспалительных реакций и окислительного стресса, которые, в свою очередь, также приводят к повреждению и окислению молекул ДНК. Одной из наиболее важных форм окисленной ДНК является 8-oxoG (7,8 - дигидро-8-оксогуанин). Повышение уровня свободной окисленной формы ДНК показано у пациентов, больных онкологическими заболеваниями, а также прошедших курс радиотерапии [137]. Существуют исследования, показавшие вклад окисленной формы ДНК в развитие эффекта свидетеля за счет повышения образования в клетках-свидетелях АФК, реактивных гидроксильных радикалов, а также реактивных форм азота [134].

МикроРНК – это некодирующие белковую последовательность молекулы РНК размером 21-23 нуклеотида. Основная функция микроРНК – регуляция экспрессии генов за счет влияния на кодирующие молекулы мРНК. Известно, что уровень микроРНК зависит от типа ткани и возраста организма, а также он способен изменяться в стрессовых условиях и, в свою очередь, влиять на процессы клеточной пролиферации, гибели, метаболизма. Нарушения функционирования молекул микроРНК тесно связано с процессом развития различных онкологических заболеваний [134]. Воздействие ИИ также влияет на уровень экспрессии микроРНК, причем существует зависимость уровня экспрессии от полученной дозы облучения, продукции АФК, типа ткани и половой принадлежности, однако точные механизмы, вовлеченные в процесс изменения уровня экспрессии остаются неизвестными [138].

Протеинкиназы – семейство ферментов, участвующих в трансдукции межклеточных сигналов. Основной катализируемый процесс- перенос фосфатной группы с молекулы АТФ на сериновые, тирозиновые и треониновые остатки аминокислот в составе белков. Протеинкиназы вовлечены в процессы регуляции клеточного роста, метаболизма, деления, апоптоза и движения, а, значит, нарушение процессов передачи сигнала за счет протеинкиназ может привести к серьезным нарушениям жизнедеятельности клетки, а значит организма в целом. Аномальная регуляция протеинкиназ наблюдается в случае большого количества раковых заболеваний, а также радиационных поражений [139].

Безусловно, на процесс развития эффекта свидетеля также влияет пол и возраст облучаемого организма, тип ткани и вид повреждающего облучения, его доза и мощность [134]. В исследованиях *in vitro* было показано, что α- и γ-облучение оказывают различный эффект на сигнальные пути, вовлеченные в реализацию эффекта свидетеля: γ-облучение существенно повышает регуляцию MAPKs пути в клетках-свидетелях [140].

Явление эффекта свидетеля находит подтверждение в исследованиях на пациентах, больных раком. Например, было показано, что развитие второго первичного рака у людей, прошедших курс радиотерапии, может быть опосредовано реализацией эффекта свидетеля на фоне полученной ранее дозы облучения [141].

В исследованиях *in vitro* было показано, что сыворотка, полученная от людей, ранее подвергнутых облучению, способна индуцировать развитие мутаций за счет нарушения окислительно-восстановительных процессов в обрабатываемых клетках [142]. Также в сыворотке крови облученных пациентов выявлен повышенный уровень некоторых микроРНК, способных влиять на окружающие ткани за счет нарушения процессов экспрессии генов в клетках-свидетелях *in vivo* [143].

На сегодняшний день точный механизм, лежащий в основе эффекта свидетеля, остается неясным. Однако совершенно определенно, что

большинство исследований указывают на развитие негативных последствии, приводящих к нестабильности генома клеток-свидетелей, и, как следствие, канцерогенезу и раку в отдаленных от первичного места облучения областях.

Таким образом, на сегодняшний день исследования эффектов малых доз ИИ – одно из важнейших направлений экспериментальной деятельности исследователей во всем мире. Данная область исследований вызывает интерес, поскольку в отличие диапазона больших доз ИИ, где изменения пропорциональны полученной дозе облучения, в диапазоне малых доз наблюдаются нелинейные изменения и развитие таких явлений, как гормезис и адаптивный ответ. Результаты исследований, получаемые на биологических моделях с различной радиочувствительностью и с применением различных источников ИИ, противоречивы и неоднозначны и вызывают сегодня множество споров. Вовлеченность в реализацию эффектов малых доз радиации большого количества факторов делает исследуемую проблему еще более сложной, требующей комплексного изучения в рамках стандартизированных условий эксперимента, обеспечивающих достоверность и воспроизводилось получаемых результатов с целью поиска общих закономерностей развития эффектов малых доз радиации и доказательств справедливости пороговой линейной концепции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

На всем протяжении исследования, продолжавшегося 64 дня, клеточная линия МСК слизистой ткани десны человека культивировалась непрерывно. Перед началом эксперимента были определенны временные точки для оценки изменений, происходящих в клеточной линии до и после облучения, и, таким образом, сформирован дизайн исследования (Рисунок 3).

2.2. Выделение культуры МСК из образца слизистой ткани десны человека

Культура МСК была выделена из неперсонифицированного образца биоптата слизистой ткани десны человека объемом 8 мм^3. Полученный биоптат инкубировали в среде DMEM F12, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфоторицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США), при 4°С не менее 8 часов. Далее образец диспергировали и инкубировали в 0,25% растворе трипсин-EDTA (Gibco, США) при 37°С в течение 1 часа, после чего реакцию останавливали внесением равного объема FBS (Gibco, США) и отмывали образец 1xPBS (300g, 7 минут). Далее образец инкубировали в 0,15% растворе коллагеназы II типа (Sigma, США) при 37°С в течение 2 часов, после чего реакцию останавливали внесением равного объема FBS и отмывали образец 1xPBS (300g, 7 минут). Полученную суспензию высевали в 25 см^2 культуральный флакон (TPP, Швеция) в составе культуральной среды MesenCult™ MSC Basal Medium Human с добавлением коммерческого соплемента (STEMCELL Technologies, Канада), антибиотиков пенициллина – стрептомицина (50 Ед/мл, ПанЭко, Россия) и L – глутамина (2мМ, ПанЭко, Россия). Культивирование первичной культуры МСК осуществлялось в течение 14 дней в условиях 5% CO2 – инкубатора при температуре 37°С и постоянной влажности.

Рисунок 3. Схема эксперимента.

2.3. Культивирование клеточной линии

Полученная неперсонифицированная клеточная линия МСК слизистой ткани десны человека была охарактеризована и стандартизирована на 3 пассаже согласно минимальным критериям Международного общества клеточной терапии [14] в ЦБМиАТ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Культивирование осуществлялось до 12 пассажа включительно. Исследование было одобрено на секции Ученого совета (выписка № 45А от 25.09.2018) и на заседании локального биоэтического комитета (Протокол № 10б от 10.10.2018) ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им А.И. Бурназяна ФМБА России.

На 5 и 6 пассажах используемая в представленном исследовании культура клеток МСК была проанализирована на предмет цитогенетических изменений методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (mFISH) (Рисунок 4). Всего было проанализировано 155 клеток: 152 клетки с нормальным кариотипом (46,XY), 3 клетки с хромосомными абберациями: хромосомный разрыв в длинном плече 4 хромосомы с образованием парного фрагмента (46,XY,chrb(4)(q31)) и сбалансированные взаимные транслокации между 6 и 15 хромосомами (46,XY, t(6;15)(p21;q11.2)), а также между 1 и 2 хромосомами (46,XY, t(1;2)(q21;p13)).

В целом, доля хромосомных аберраций в культуре составила не более 2%, что не превышает спонтанного уровня хромосомных аберраций у человека. Таким образом, исследуемая клеточная линия может считаться генетически стабильной с низким уровнем хромосомных аберраций [144].

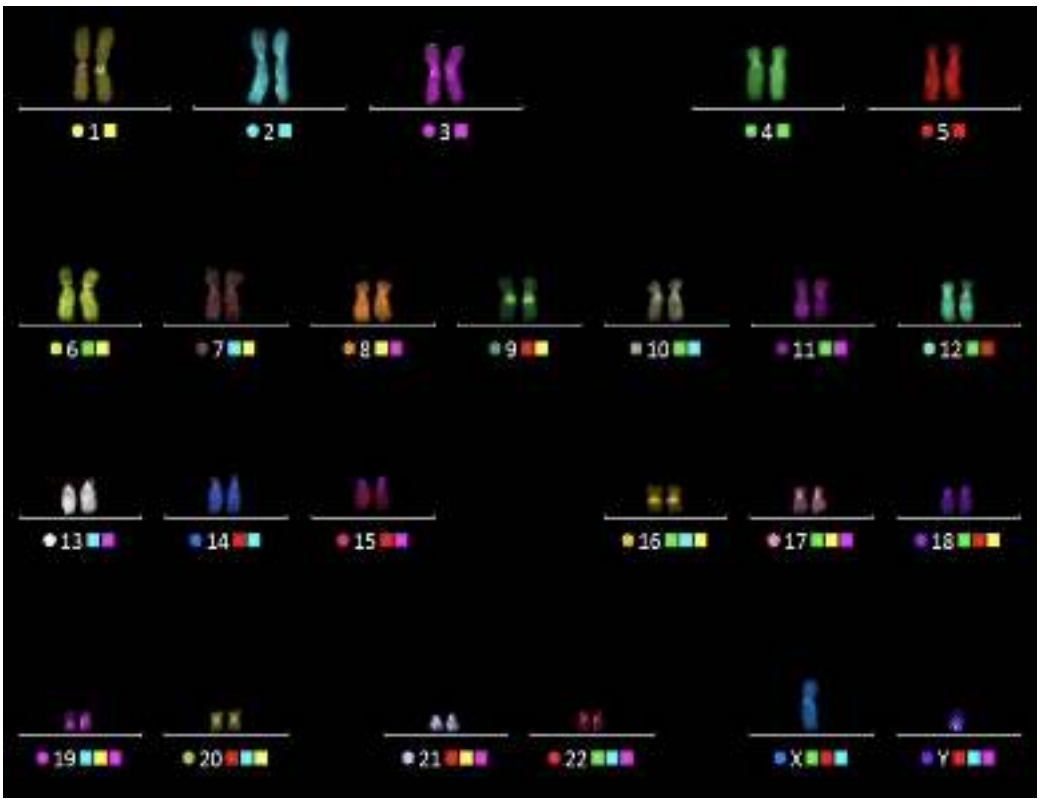


Рисунок 4. Кариограмма используемой в исследовании линии МСК слизистой ткани десны человека (5 пассаж).

Ведение клеточной линии осуществлялось с использованием полной культуральной среды MesenCult™ MSC Basal Medium Human (STEMCELL Technologies, Канада) с добавлением коммерческого соплемента (STEMCELL Technologies, Канада), антибиотиков пенициллина – стрептомицина (50 Ед/мл, ПанЭко, Россия) и L – глутамина (2мМ, ПанЭко, Россия) в условиях 5% CO2 – инкубатора при температуре 37°С и постоянной влажности. Культивирование клеточной линии проводили при достижении ей 90% конфлюэнтности на поверхности культурального флакона. Клетки снимали с поверхности культурального флакона (TPP, Швеция) добавлением раствора 0,25% трипсин-ЭДТА (Gibco, США) с последующей инкубацией в течение 3 минут при 37°С, после чего ферментативную реакцию останавливали внесением равного объема FBS (Gibco, США). Поверхность флакона дважды отмывалась однократным фосфатным буфером (1xPBS, Gibco, США). Полученную суспензию клеток собирали в 50 мл пробирку, после чего

клетки осаждались центрифугированием (300g, 7 мин). Полученная надосадочная жидкость аспирировалась, а осадок клеток растворялся в 1xPBS. Для подсчета клеток и их выживаемости аликвоту полученной суспензии в равном объеме смешивали с раствором трипанового синего и анализировали на счетчике клеток (Countess II Automated Cell Counter, Invitrogen). В дальнейшем полученную суспензию клеток с известной концентрацией высевали на новый культуральный флакон (или планшет), анализировали или криоконсервировали.

2.4. Криоконсервирование клеточной линии

Из суспензии клетки осаждались центрифугированием (300g, 7 мин), после чего надосадочная жидкость аспирировалась, а полученный осадок клеток растворяли в 1 мл охлажденной полной культуральной среды. Далее к полученной суспензии клеток при температуре +4°C и постоянном помешивании покапельно добавляли 1мл полной культуральной среды с 10% ДМСО (WAK-Chemie, Германия) до конечной концентрации ДМСО 5%. Полученную суспензию клеток переносили в криопробирку (Corning, США) и замораживали в парах азота с последующим переносом в жидкий азот для длительного хранения в криокранилище ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

2.5. Криоконсервирование и хранение кондиционированных сред

Полученные от исследуемых групп клеток кондиционированные среды были разаликвочены в 1,5 мл пробирки Eppendorf (Германия) и заморожены при температуре -80°C. Повторное замораживание кондиционированных сред не допускалось.

2.6. Условия облучения

Клетки облучали на 4 пассаже в логарифмической фазе роста при достижении ими 70% конфлюэнтности на поверхности культурального флакона.

Облучение в дозах 50, 100, 250, 1000 мГр осуществляли в дублях на рентгеновской установке РУСТ-М1 (Россия) с заданными характеристиками (Таблица 1) при температуре 4°С. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях 5% CO2 – инкубатора при 37°С и постоянной влажности. Погрешность испускаемой дозы не превышала 15%.

Таблица 1. Характеристики рентгеновской установки РУСТ-М1 (Россия).

Параметр	**Значение**
Мощность дозы	39 мГр/мин
Напряжение	100 кВ
Ток пучка	0,8 мА
Фильтр алюминиевый	1,5 мм

Согласно рекомендациям МКРЗ дозы 50 и 100 мГр относятся к диапазону малых доз ИИ, дозы 250 и 1000 мГр – к диапазону средних доз ИИ [1].

2.7. Иммунофенотипирование клеток

Оценку уровня поверхностных антигенов МСК осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США), оснащенного двумя лазерами 488 нм и 633 нм. Калибровку прибора перед проводимыми измерениями осуществляли с использованием коммерческого набора BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit, а также BD CompBeads Anti-Mouse Ig для компенсационных настроек протокола.

Клетки окрашивали флуоресцентно-меченными антителами и красителями (BD Bioscience, США) согласно представленной панели (Таблица 2).

Таблица 2. Панель флуоресцентно-меченных антител и красителей для окраски МСК.

Пробирка 1	**Пробирка 2**	**Пробирка 3**	**Пробирка 4**	**Пробирка 5**
Неокрашенный контроль	7AAD (Оценка выживаемости)	CD45 FITC	CD34 FITC	CD44 FITC
		CD90 PE	CD73 PE	CD117 APC
		CD105 APC	HLA-DR APC	-

В каждой исследуемой пробирке окрашивалось не менее 10^5 клеток. Флуоресцентно-меченные антитела и красители вносились согласно необходимому количеству, указанному на флаконе или установленному в процессе индивидуального титрования каждого из антител. Полученную суспензию инкубировали 15 минут при комнатной температуре в темноте, после чего в каждую пробирку вносили 3 мл 1xPBS и осаждали клетки центрифугированием (300g, 7 минут). Полученный осадок клеток ресуспендировали в 150 мкл 1xPBS и анализировали в течение часа.

2.8. Оценка концентрации общего белка в кондиционированной среде

Аликвоты кондиционированных сред, полученные от клеток в нескольких временных точках после облучения, размораживались в водяной бане при 37°C, после чего центрифугировались (250g, 2 мин) с целью удаления возможных остатков клеточного дебриса. Оценку концентрации общего белка в кондиционированных средах осуществляли с использованием коммерческого набора Qubit™ Protein Assay Kit на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя.

2.9. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ растворимых факторов кондиционированных сред, полученных через 48 часов, 9, 23, 43, 64 дня после облучения, осуществлялся с использованием коммерческих наборов:

1. Human IL-8/CXCL8 Quantikine Elisa Kit (R&D systems a bio-techne brand, cat. D8000C),
2. Human IL-6 Elisa Kit (Invitrogen, cat. BMS213-2),
3. Human IL10 Elisa kit (Invitrogen, cat. BMS215-2),
4. Human VEGF-A Elisa kit (Invitrogen, cat. BMS277-2),
5. Human IDO Elisa kit (Invitrogen, cat. EH246RB).

Учет результатов осуществлялся на планшетном ридере iMark Bio-Rad с помощью программного обеспечения Zemfira. Результаты исследования представлены с учетов количества клеток в культуральном флаконе на момент сбора кондиционированной среды (пг/10^6 клеток).

2.10. Оценка пролиферативной активности клеток

Оценку пролиферативной активности клеток осуществляли с использованием клеточного анализатора xCelligence RTCA (ACEA Biosciences, США), инсталированного в CO2 - инкубаторе и позволяющего в режиме реального времени оценивать пролиферативную активность клеточных культур благодаря детекции так называемого клеточного индекса (КИ) (электрического сопротивления на дне лунки, покрытой золотом). Суспензия клеток высевалась в лунки коммерческих культуральных планшетов E-plate 16 (ACEA Biosciences, США) в количестве 1500 клеток/лунка, после чего в режиме реального времени производился мониторинг значений КИ. Результаты исследований представлены в виде нормализованного клеточного индекса (НКИ), рассчитанного путем анализа полученных значений КИ в программном обеспечении xCelligence RTCA: значения КИ в определенной временной точке – точке нормализации (например, когда клетки были простимулированы), устанавливается

программным обеспечением в качестве 1,0. Все последующие во времени значения КИ представляются в виде пропорции к КИ в точке нормализации.

2.11. Оценка клеточных поколений

Оценку клеточных поколений осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII с использованием коммерческого набора CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry (Invitrogen). После облучения клетки окрашивались флуоресцентным красителем согласно протоколу производителя, после чего высевались в лунки 6-луночного планшета и культивировались в стандартных условиях. Оценка состава клеточных поколений осуществлялась через 24, 48, 72 и 96 часов после окрашивания. Учет состава клеточных поколений осуществлялся в соответствии с интенсивностью флуоресценции клеточной популяций: интенсивность флуоресценции клеток, прошедших деление, снижается за счет того, что краситель равномерно распределяется между двумя новыми клетками. И, таким образом, материнская клетка флуоресцирует ярче, чем две дочерние.

2.12. Культивирование необлученных МСК в кондиционированных средах облученных культур клеток

Оценка пролиферативной активности необлученных МСК слизистой ткани десны человека, культивируемых в кондиционированных средах облученных исследуемых групп МСК, осуществлялась на клеточном анализаторе xCelligence RTCA (ACEA Biosciences, США), инсталированного в CO2 - инкубаторе и позволяющего в режиме реального времени оценивать пролиферативную активность клеточных культур благодаря детекции так называемого клеточного индекса (КИ). Результаты исследований представлены в виде нормализованного клеточного индекса (НКИ), рассчитанного путем анализа полученных значений КИ в программном обеспечении xCelligence RTCA: значения КИ в определенной временной

точке – точке нормализации (например, когда клетки были простимулированы), устанавливается программным обеспечением в качестве 1,0. Все последующие во времени значения КИ представляются в виде пропорции к КИ в точке нормализации.

Необлученные МСК слизистой ткани десны человека высевали в лунки коммерческих культуральных планшетов E-plate 16 (ACEA Biosciences, США) в количестве 1500 клеток/лунка, где культивировали в 200 мкл полной культуральной среды MesenCult™ MSC Basal Medium Human (STEMCELL Technologies) с добавлением коммерческого соплемента (STEMCELL Technologies), антибиотиков пенициллина – стрептомицина (50 Ед/мл, ПанЭко) и L – глутамина (2 мМ, ПанЭко) в условиях 5% CO2 – инкубатора при 37°С и постоянной влажности. Через 48 часов из лунок отбирали 150 мкл культуральной среды и вносили 150 мкл кондиционированной среды, полученной от культуры МСК слизистой ткани десны человека облученных в дозах 50, 100, 250 и 1000 мГр, после чего клетки возвращали в стандартные условия культивирования. Далее оценку пролиферативной активности МСК проводили с помощью клеточного анализатора xCelligence RTCA (ACEA Biosciences, США).

2.13. Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (Statsoft, США). Значимость различий оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента для связанных выборок. Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов не менее трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение. Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изменения профиля поверхностных антигенов МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения

Перед началом исследования была проведена оценка уровня экспрессии поверхностных антигенов необлученных клеток (Таблица 3). Уровень экспрессии соответствовал требованиям, предъявляемым к МСК Международным обществом клеточной терапии [14].

Таблица 3. Профиль поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны перед облучением.

Параметр	7AAD (Выжива-емость)	CD45	CD34	CD105	CD90	CD73	HLA -DR	CD44	CD117
	Количество клеток, %								
	95,2±0,30	0,0± 0,00	0,0± 0,00	99,9±0,75	99,9±0,00	99,9±0,50	0,0± 0,00	99,9±0,52	99,9±0,70

Оценка экспрессии профиля поверхностных антигенов осуществлялась через 9, 16, 43 и 64 дня после облучения МСК в дозах 50, 100, 250 и 1000 мГр. Через 9 дней после облучения были обнаружены статистически значимые изменения уровня экспрессии поверхностного антигена CD117 для групп МСК, облученных в дозах 50, 100 и 250 мГр (Таблица 4).

Наблюдалось дозозависимое изменение экспрессии CD117, наибольшим снижением экспрессии характеризовались МСК, облученных в дозе 50 мГр – 87,1±2,19% ($p<0,05$) (Рисунок 5).

Таблица 4. Экспрессия поверхностных антигенов МСК через 9 дней после облучения.

Параметр	К	50 мГр	100 мГр	250 мГр	1000 мГр
	Количество клеток, %				
7AAD (Выживаемость)	98,0±0,00	98,0±0,10	97,5±0,20	99,0±0,11	98,0±0,09
CD45	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD90	99,9±0,00	99,9±0,20	99,9±0,12	99,9±0,00	99,9±0,08
CD105	99,9±0,15	99,9±0,24	99,9±0,21	99,9±0,10	99,9±0,00
CD34	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD73	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,23	99,9±0,33	99,9±0,19
HLA-DR	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD44	99,9±0,00	98,6±0,20	99,9±0,36	99,9±0,16	99,9±0,31
CD117	97,0±1,50	87,1±2,19*	89,2±2,88*	93,0±0,50*	99,0±1,01

* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

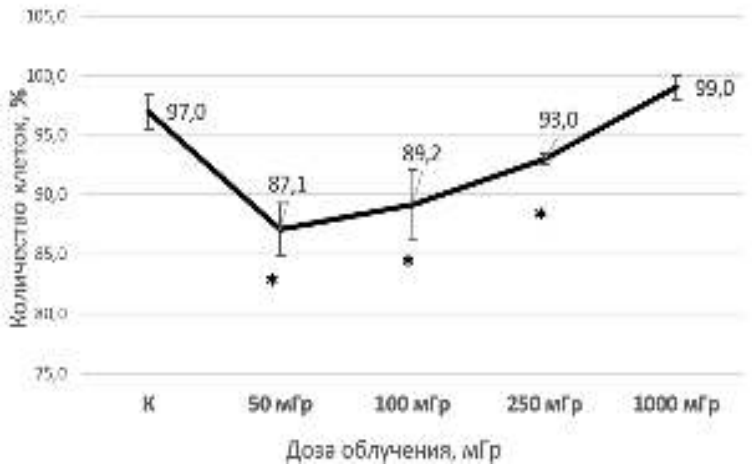
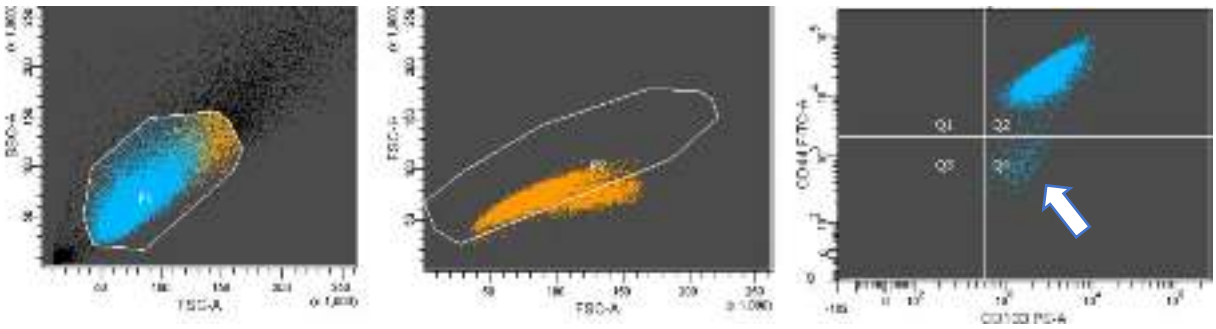


Рисунок 5. Зависимость экспресии поверхностного антигена МСК CD117 от полученной дозы ИИ через 9 дней после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Также для группы МСК, облученной в дозе 50 мГр, наблюдалось появление четко обособленной популяции клеток с отрицательной экпрессией CD44 – 1,4±0,23% ($p\leq0,001$) клеток демонстрировали полную потерю данного АГ на своей поверхности (Рисунок 6).



(а) (б) (в)

Рисунок 6. Скатерограммы: (а) – выделение гейта МСК по параметрам каналов прямого и бокового светорассеяния; (б) – выделение гейта синглетных МСК по параметрам каналов прямого светорассеяния; (в) – выделение гейта МСК с отрицательной экспрессией поверхностного антигена CD44 через 9 дней после облучения в дозе 50 мГр.

Через 16 дней после облучения наблюдалась практическая полная потеря экспрессии поверхностного антигена CD117 во всех исследуемых группах МСК (Таблица 5).

Таблица 5. Экспрессия поверхностных антигенов МСК через 16 дней после облучения.

Параметр	**К**	**50 мГр**	**100 мГр**	**250 мГр**	**1000 мГр**
	Количество клеток, %				
7AAD (Выживаемость)	99,9±0,09	99,0±0,13	99,0±0,21	99,2±0,00	99,9±0,00
CD45	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD90	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,00	99,6±0,49
CD105	99,8±0,14	99,0±0,99	99,6±0,07	99,5±0,28	99,7±0,14
CD34	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD73	98,7±1,77	98,7±1,70	97,9±0,21	96,5±0,28	99,5±0,49
HLA-DR	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD44	98,8±0,99	99,5±0,07	98,6±0,92	98,7±0,85	97,9±1,27
CD117	0,5±0,07	0,7±0,21	0,6±0,21	0,6±0,14	1,5±0,42*

* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

При этом наиболее высоким уровень экспрессии данного поверхностного АГ оставался в группе МСК, облученной в дозе 1000 мГр – 1,5±0,42% ($p<0,05$) (Рисунок 7). Для остальных облученных групп МСК статистически значимых отличий уровня экспрессии CD117 в сравнении с необлученной группой контроля не наблюдалось.

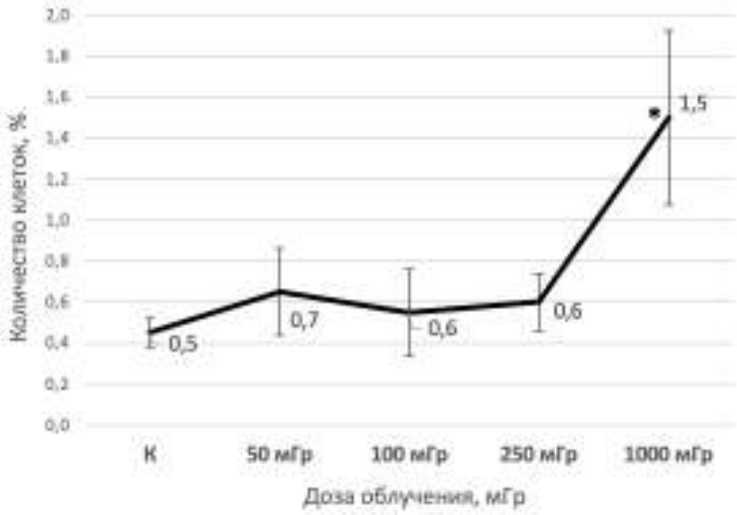


Рисунок 7. Зависимость экспресии поверхностного антигена МСК CD117 от полученной дозы ИИ через 16 дней после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Также на 16 день после облучения МСК, изменения происходили в уровнях экспрессии поверхностных антигенов CD90 и CD73. Наблюдалась не полная потеря данных поверхностных АГ частью клеточной популяции, т.е. снижение плотности их экспрессии – в зоне положительных значений появлялась обособленная популяция клеток со сниженной интенсивностью флуоресценции (Таблица 6).

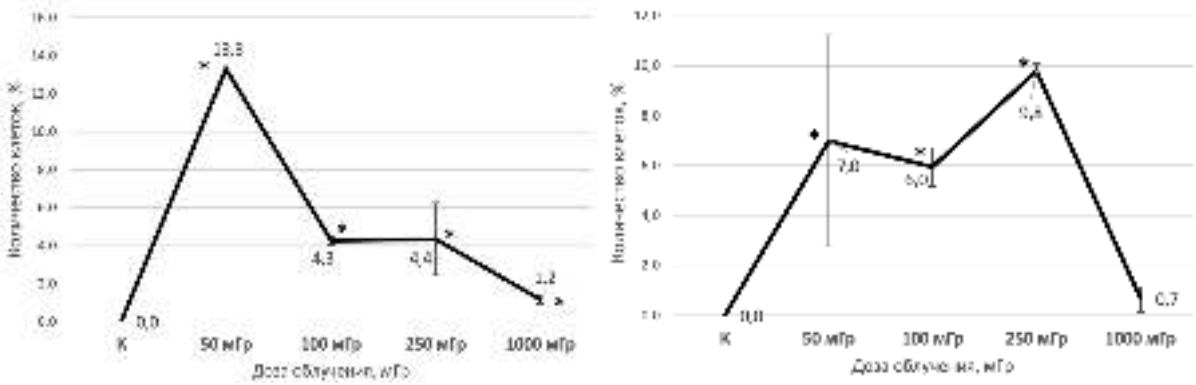
Таблица 6. Количество клеток со сниженной плотностью экспрессии поверхностных антигенов CD90 и CD73 через 16 дней после облучения.

Параметр	**К**	**50 мГр**	**100 мГр**	**250 мГр**	**1000 мГр**
	Количество клеток, %				
CD90	0,0±0,00	13,3±0,14*	4,3±0,21*	4,4±1,91*	1,2±0,21*
CD73	0,0±0,00	7,0±4,24*	6,0±0,78*	9,8±0,28*	0,7±0,49

* (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Для уровня экспрессии CD90 также наблюдались дозозависимые изменения: статистически значимым снижением плотности экспрессии характеризовались группы МСК, облученные в дозах 50, 100 и 250 мГр (Рисунок 8 а).

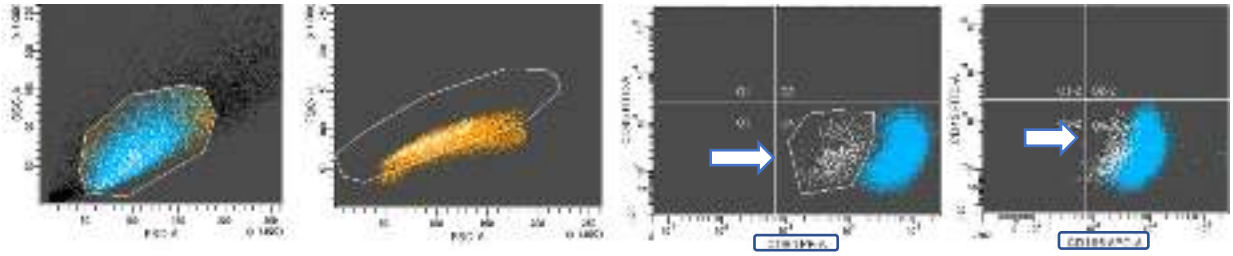
Снижением плотности экспрессии CD73 характеризовались все облученные группы МСК, наиболее выраженное снижение экспрессии было характерно для групп клеток, облученных в дозах 50, 100 и 250 мГр (Рисунок 8 б).



(а) (б)

Рисунок 8. Зависимость экспрессии поверхностных антигенов МСК CD90 и CD73 от полученной дозы ИИ через 16 дней после облучения. (а) – снижение плотности экспресии поверхностного АГ CD90, (б) – снижение плотности экспресии поверхностного АГ CD73. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Также группы МСК, демонстрировавшие снижение плотности экспрессии поверхностного АГ CD90, характеризовались менее выраженным снижением плотности экспрессии поверхностного АГ CD105, детектируемом на скатерограммах (Рисунок 9).



(а) (б) (в) (г)

Рисунок 9. Скатерограммы: (а) – выделение гейта МСК по параметрам каналов прямого и бокового светорассеяния; (б) – выделение гейта синглетных МСК по параметрам каналов прямого светорассеяния; (в) – выделение гейта МСК со сниженной плотностью экспресии поверхностного антигена CD90 через 16 дней после облучения в дозе 50 мГр; (г) – выделение гейта МСК со сниженное плотностью экспресии поверхностного антигена CD105 через 16 дней после облучения в дозе 50 мГр.

Через 43 дня после облучения статистически значимых изменений экспрессии поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны не наблюдалось (Таблица 7).

Таблица 7. Экспрессия поверхностных антигенов МСК через 43 дня после облучения.

Параметр	К	50 мГр	100 мГр	250 мГр	1000 мГр
	Количество клеток, %				
7AAD (Выживаемость)	99,0±0,01	99,9±0,20	99,0±0,00	99,9±0,02	99,8±0,12
CD45	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD90	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,00
CD105	99,8±0,00	99.9±0,07	99,9±0,00	99,9±0,07	98,1±2,55
CD34	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD73	99,9±0,00	99,9±0,07	99,9±0,00	99,9±0,07	99,9±0,00
HLA-DR	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD44	99,4±0,49	99,5±0,21	99,5±0,21	99,0±0,49	98,1±0,69
CD117	0,2±0,14	0,5±0,47	0,3±0,07	0,3±0,07	0,3±0,07

Через 64 дня после облучения наблюдались изменения уровня экспрессии поверхностного антигена CD44 (Таблица 8).

Таблица 8. Экспрессия поверхностных антигенов МСК через 64 дня после облучения.

Параметр	К	50 мГр	100 мГр	250 мГр	1000 мГр
	Количество клеток, %				
7AAD (Выживаемость)	99,0±0,00	99,3±0,00	99,0±0,00	99,8±0,00	99,0±0,01
CD45	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD90	99,9±0,00	99,9±0,00	99,9±0,16	99,9±0,03	99,9±0,00
CD105	99,3±0,21	99,2±0,42	99,4±0,07	99,1±0,28	99,7±0,07
CD34	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD73	98,6±1,84	99,6±0,49	99,4±0,71	99,9±0,00	99,9±0,00
HLA-DR	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
CD44	98,8±0,57	94,5±0,51*	98,7±0,57	99,2±0,21	99,1±0,64
CD117	0,5±0,21	0,3±0,00	0,3±0,07	0,5±0,21	0,2±0,07

* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Снижение уровня экспрессии поверхностного АГ CD44 в сравнении с необлученной группой контроля было характерно для группы клеток, облученной в дозе 50 мГр – 94,5±0,51% (p<0,05) (Рисунок 10).

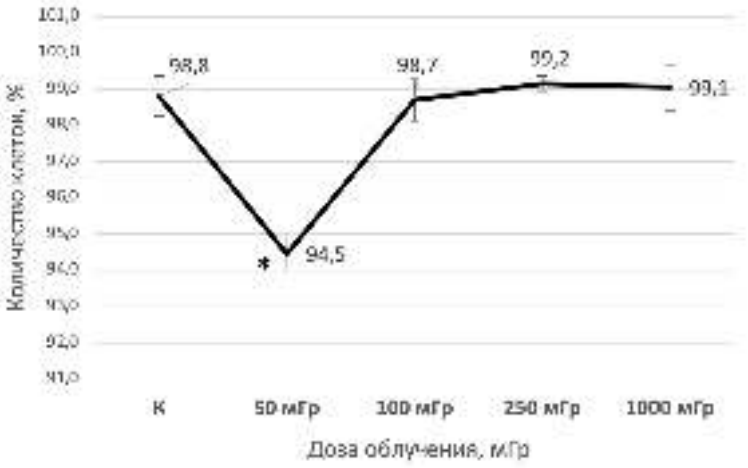


Рисунок 10. Зависимость экспрессии поверхностного антигена МСК CD44 от полученной дозы ИИ через 64 дня после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют, что экспрессия поверхностных антигенов МСК CD117, CD90 и CD73, изменяется в ранние сроки культивирования (9 и 16 дней) после облучения малыми (50 и 100 мГр) и средней (250 мГр) дозами ИИ. В тоже время изменение уровня экспрессии поверхностного АГ CD44 под влиянием облучения в дозе 50 мГр происходило как в ранние (9 дней), так и отдаленные (64 дня) сроки культивирования после облучения.

Одно из самых ранних (9 день после облучения) наблюдаемых изменений – снижение экспрессии поверхностного АГ CD117 – протонкогена, рецептора SCFR, играющего роль в процессах пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток [41,42]. Снижение экспрессии было характерно для МСК, облученных в малых и средней дозах ИИ (50, 100 и 250 мГр) и наиболее выраженным оно было для группы клеток, получивших малую дозу облучения 50 мГр – 87,1±2,19% (p<0,05).

Наблюдаемая зависимость эффекта от дозы облучения (Рисунок 5) отражает описанную в литературе закономерность, наблюдаемую в диапазоне доз до 1000 мГр: клетки, изначально чувствительные к облучению, с повышением дозы становятся устойчивыми к повреждающему действию радиации – радиочувствительность сменяется радиорезистентностью [109]. Через 16 дней после облучения все исследуемые группы МСК практически утрачивали экспрессию CD117 на своей поверхности, и его уровень был сравним с уровнем экспрессии в необлученной группе контроля – 0,5±0,07% ($p<0,05$). В то же время группа МСК, получившая дозу облучения 1000 мГр, демонстрировала повышенный уровень экспрессии CD117 в сравнении с уровнем в необлученной группе контроля – 1,5±0,42% ($p<0,05$) (Рисунок 7). т.е. на основании результатов, полученных ранее через 9 дней после облучения, можно предположить, что облучение в дозах ИИ 50, 100 и 250 мГр приводит к ускорению потери экспрессии CD117 на поверхности МСК слизистой ткани десны *in vitro*.

Также на 16 день после облучения малыми и средней дозами ИИ (50, 100 и 250 мГр) для МСК наблюдалось снижение плотности экспрессии поверхностных АГ CD90 и CD73, а также менее выраженное снижение экспрессии CD105. Данные поверхностные антигены являются ключевыми для характеристики МСК согласно минимальным критериям, выдвинутым Международным обществом клеточной терапии [14], поэтому наблюдаемое снижение плотности их экспрессии позволяет предположить, что клетки претерпевают изменения, сказывающиеся на степени их стволовости и потенциях к дифференцировке.

Наблюдаемое снижение плотности экспрессии поверхностного АГ CD90 может быть описано, как зависимость доза-эффект (Рисунок 8 а). При этом наиболее выраженным снижением плотности экспрессии CD90 характеризовалась группа клеток, получившая малую дозу облучения 50 мГр – 13,3±0,14% ($p<0,05$). Описываемая закономерность также, как и в случае снижение экспрессии CD117 через 9 дней после облучения, находит

отражение в литературе и может указывать на то, что радиочувствительность МСК сменяется радиорезистентностью с увеличением дозы облучения.

Согласно литературным данным поверхностный АГ CD73 является компонентом аденозинергического пути – ключевого в реализации иммуномодулирующих функций МСК [19], также его положительная экспрессия в тандеме с ALP+ рассматривается как маркер высокого потенциала остеогенной дифференцировки [20]. В свою очередь функция поверхностного АГ CD90 для МСК до конца не выяснена, однако установлено, что снижение уровня экпрессии CD90 приводит к усилению дифференцировочного потенциала МСК в остеогенном и адипогенном направлениях *in vitro* [21]. Таким образом, складывается некоторое противоречие: с одной стороны снижение экспрессии CD90 свидетельствует об усилении дифференцировочного потенциала МСК в адипогенном и остеогенном направлениях, с другой – снижение экспрессии CD73 может указывать на его снижение в остеогенном направлении. Однако, поскольку исследование ALP+ не являлось задачей настоящего исследования, нельзя однозначно судить о единообразии закономерностей, наблюдаемых в представленном исследовании и в исследовании Daisy D. Canepa и соавт [20]. К тому же, представленное исследование позволяет лишь косвенно (на основании скатерограмм прямого и бокового светорассеяния) судить о том, что потеря данных поверхностных АГ происходит на клетке одновременно, существует вероятность, что обнаруженные изменения указывают на появление двух отдельных клеточных популяций, демонстрирующих независимое снижение экспрессии CD90 и CD73.

Интересно также, что выявленная в исследовании Moraes DA и соавт. [21] закономерность влияния CD90 на дифференцировочный потенциал МСК, находит некоторое противоречие, поскольку известно, что между процессами адипогенной и остеогенной дифференцировки в организме человека существует «обратная зависимость» – усиление одного процесса приводит к угнетению другого [26, 27] (Рисунок 1). Однако, для

рассматриваемой популяции клеток одновременно со снижением плотности экспрессии CD90 в представленном исследовании было обнаруженное менее выраженное снижение экспрессии поверхностного АГ CD105, что на основании данных литературы также может указывает на возможность усиления дифференцировочного потенциала МСК в адипогенном и остеогенном направлениях [33], и к тому же снижение их функциональной активности в целом [31,32].

Таким образом, на основании вышеизложенного, можно предположить, что наблюдаемые изменения экспрессии поверхностных АГ CD117, CD73, CD90 и CD105 позволяют косвенно судить об изменениях функциональной активности МСК, в частности, дифференцировочного потенциала в адипогенном и остеогенном направлениях, происходящих под влиянием ИИ.

Наряду с описанными изменениями экспрессии поверхностных АГ МСК (CD117, CD73, CD90 и CD105), в ранние (9 дней) и отдаленные (64 дня) сроки культивирования после облучения малой дозой ИИ 50 мГр наблюдалось снижение уровня экспрессии поверхностного АГ CD44 – рецептора гиалуроновой кислоты [36], вовлеченного в регуляцию процессов миграции, пролиферации, адгезии, а также дифференцировки и выживаемости клеток [34,35].

Некоторые исследования демонстрируют взаимосвязь между экспрессией поверхностных АГ CD90 и CD44: снижение экспрессии CD90 приводит к снижению экспрессии CD44, что также может быть связано со сдвигом МСК в сторону состояния более восприимчивого к дифференцировке [21, 22]. В случае влияния, оказываемого облучением малыми и средними дозами ИИ на МСК слизистой ткани десны человека, подобная закономерность наблюдалась лишь для группы клеток, облученных малой дозой ИИ 50 мГр, однако снижение уровня экспрессии CD44 и CD90 происходил в разные временные промежутки – 9, 64 и 16 дней, соответственно. Вероятно, что закономерности, лежащие в основе снижения

уровня экспрессии CD44 после облучения малыми дозами ИИ, отличаются от таковых в проводимых ранее исследованиях [21, 22].

Таким образом, становятся очевидными эффекты, оказываемые облучением в малых и средней дозах ИИ (50, 100 и 250 мГр) на профиль поверхностных АГ МСК. Изменения, наблюдаемые для экспрессии CD117, CD90, CD73 и CD105 проявляются в ранние сроки культивирования после облучения – 9 и 16 дней, а для CD44 как в ранние – 9 дней, так и в отдаленные сроки – 64 дня культивирования после облучения.

Благодаря доступности, стандартизации и точности метода проточной цитофлуориметрии, поверхностные АГ МСК могут выступить в качестве перспективного критерия оценки рисков воздействия облучения в малых дозах на организм человека. Безусловно, еще предстоит выяснить точные функциональные причины, наблюдаемых изменений экспрессии, дополнить изученную панель поверхностных антигенов МСК, а также оценить наблюдаемые изменения экспрессии в контексте накопления и репарации двунитевых разрывов ДНК.

3.2. Изменения секреторного профиля МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения

Через 48 часов, 9, 23, 43 и 64 дня после облучения проводилась оценка концентрации общего белка в кондиционированных средах исследуемых групп клеток (Таблица 9).

Таблица 9. Концентрация общего белка в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.

Параметр	**К**	**50 мГр**	**100 мГр**	**250 мГр**	**1000 мГр**
	Концентрация общего белка, мг/10^6 клеток				
48 часов	4,9±0,14	5,5±0,05*	5,8±0,00*	5,8±0,15*	5,1±0,22
9 дней	9,5±0,29	6,1±0,54*	7,6±0,62*	8,4±0,27*	8,3±0,03*
23 дня	7,1±0,49	7,3±1,07	8,4±1,18	8,2±0,57	7,3±0,51
43 дня	7,6±0,38	7,8±0,59	6,9±0,28	7,3±0,25	8,1±1,08
64 дня	5,0±0,34	5,4±0,06	5,0±0,28	5,6±0,05	5,7±0,19

* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Было установлено, что через 48 часов после облучения концентрация общего белка в кондиционированной среде статистически достоверно возрастала для групп МСК, облученных в малых и средней дозах ИИ: 50 мГр – 5,5±0,05 мг/10^6 клеток ($p<0,05$), 100 мГр – 5,8±0,00 мг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 250 мГр – 5,8±0,15 мг/10^6 клеток ($p<0,05$), при этом для группы клеток, облученных в дозе 1000 мГр, значение концентрации общего белка в кондиционированной среде оставалось на уровне концентрации необлученной группы контроля, наблюдалась зависимость доза-эффект (Рисунок 11)

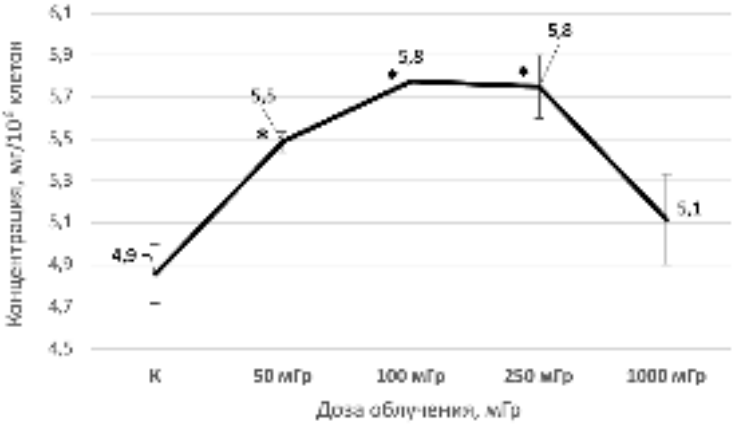


Рисунок 11. Зависимость концентрации общего белка в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 9 дней после облучения все облученные группы клеток демонстрировали достоверное дозозависимое снижение концентрации общего белка в кондиционированной среде в сравнении с концентрацией необлученной группы контроля, для МСК, облученных в малой дозе 50 мГр, наблюдалось наименьшее значение концентрации общего белка – 6,1±0,54 мг/10^6 клеток (p<0,05) (Рисунок 12).

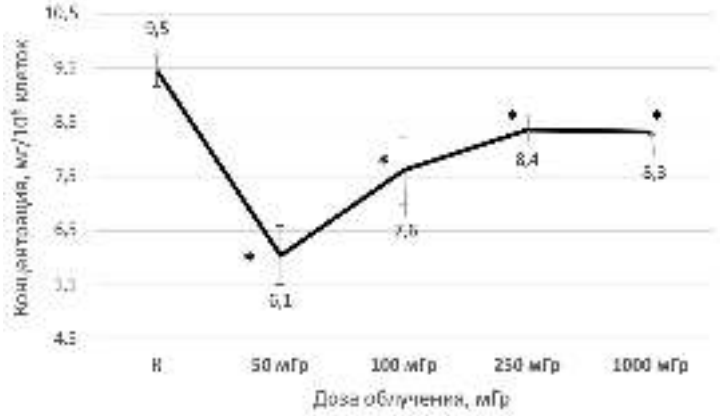


Рисунок 12. Зависимость концентрации общего белка в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 9 дней после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 24, 43 и 64 дня после облучения концентрация белка в кондиционированной среде для всех облученных групп МСК оставалась сравнима с концентрацией белка в кондиционированной среде необлученной группы контроля (Рисунок 13).

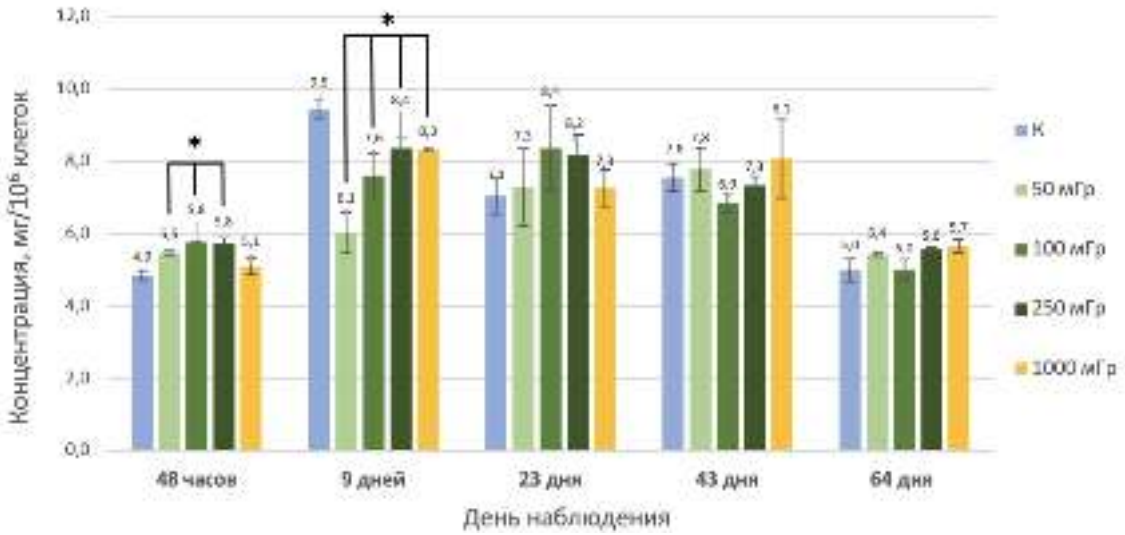


Рисунок 13. Концентрация общего белка в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.
* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

В рамках исследования секреторного профиля была также проведена количественная оценка некоторых растворимых факторов в кондиционированных средах облученных МСК при длительном культивировании *in vitro:* ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, VEGF-A и IDO. Исследование проводилось в нескольких временных точках: 48 часов, 9, 24, 43 и 64 дня после облучения.

Достоверно установлено, что МСК слизистой ткани десны человека не секретируют в культуральную среду такие растворимые факторы, как ИЛ-10 и IDO ни в начальные, ни в отдаленные сроки культивирования. Также указанные факторы не были обнаружены в кондиционированных средах ни в ранние, ни в отдаленные сроки культивирования после облучения МСК малыми и средними дозами ИИ – 50, 100, 250 и 1000 мГр.

Напротив, во всех исследуемых временных точках была отмечена секреция ИЛ-6, ИЛ-8 и VEGF-A как в контрольной, так и в облученных группах МСК слизистой ткани десны человека.

Значения концентраций ИЛ-6 в кондиционированных средах исследуемых групп МСК во всех исследуемых временных точках представлены в Таблице 10.

Таблица 10. Концентрация ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.

Параметр	**К**	**50 мГр**	**100 мГр**	**250 мГр**	**1000 мГр**
	Концентрация ИЛ-6, пг/10^6 клеток				
48 часов	39,5±0,75	52,2±2,75*	44,0±0,74*	35,2±0,56*	37,1±0,00*
9 дней	66,2±2,94	55,0±17,75	76,1±18,81	68,0±10,58	77,4±12,73
23 дня	46,1±5,57	48,0±6,86	43,9±5,55	49,5±2,15	54,8±14,06
43 дней	76,8±2,55	70,1±2,37	79,2±14,21	63,3±2,85*	52,4±6,74*
64 дня	34,0±1,04	23,9±3,62*	28,1±1,81*	26,8±1,26*	27,7±0,51*

* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 48 часов после облучения малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр МСК демонстрировали повышение уровня ИЛ-6 в кондиционированной среде– 52,2±2,75 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 44,0±0,74 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно. В то же время для МСК, облученных в средних дозах 250 и 1000 мГр, концентрация ИЛ-6 в кондиционированной среде снижалась – 35,2±0,56 пг/10^6 клеток и 37,1±0,00 пг/10^6 клеток, соответственно. В целом, была отмечена зависимость доза-эффект (Рисунок 14).

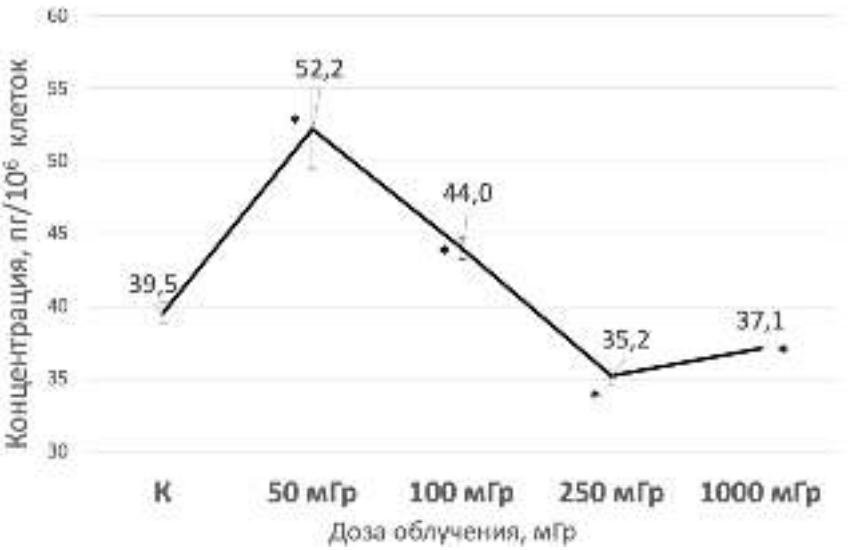


Рисунок 14. Зависимость концентрации ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

В отдаленные сроки культивирования через 43 и 64 дня после облучения также наблюдалось изменение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде облученных групп клеток (Рисунок 15).

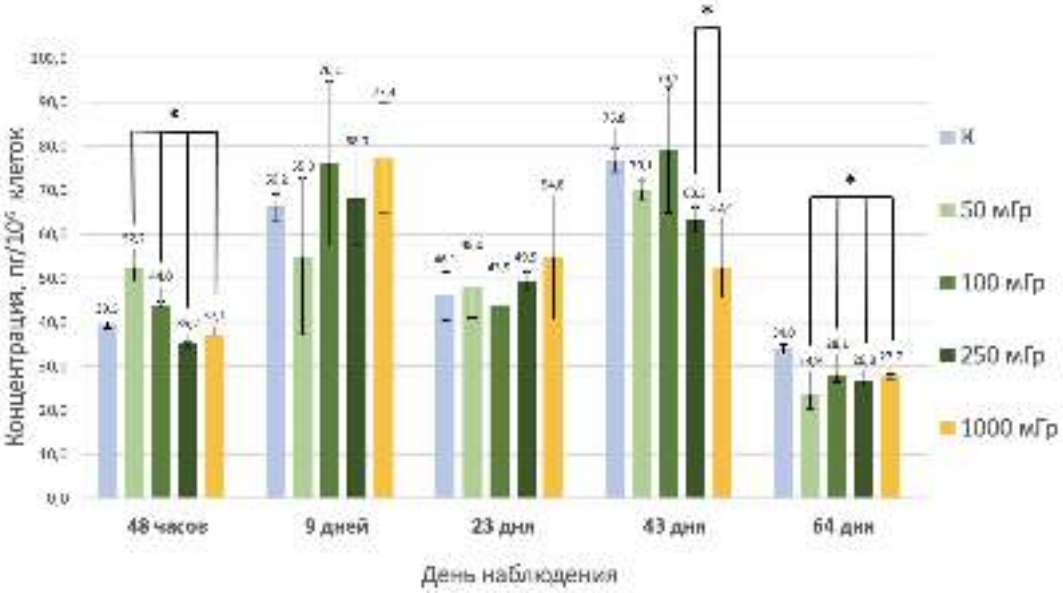


Рисунок 15. Концентрация ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 43 дня после облучения МСК средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр наблюдалось статистически значимое снижение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде – 63,3±2,85 пг/10^6 клеток и 52,4±6,74 пг/10^6 клеток, соответственно (Рисунок 16). Наблюдалась зависимость доза-эффект.

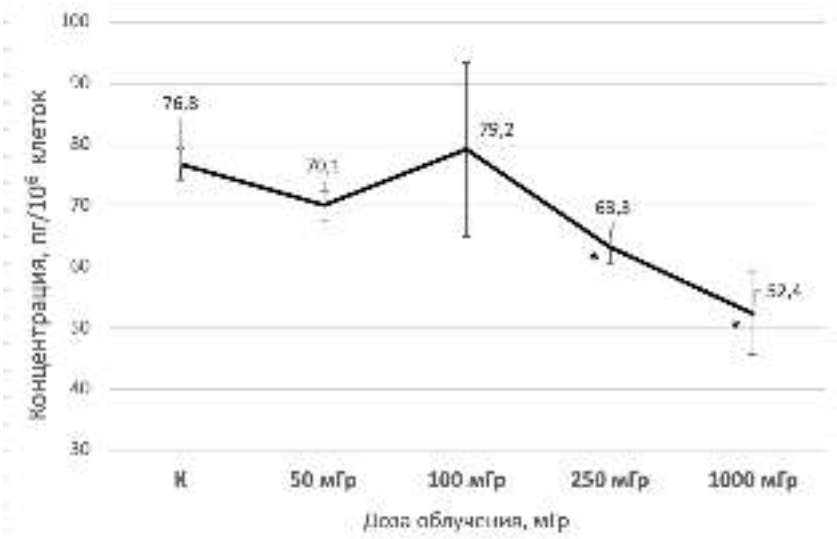


Рисунок 16. Зависимость концентрации ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 43 дня после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 64 дня после облучения статистически значимое снижение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде наблюдалось для групп МСК, облученных как малыми – 50 и 100 мГр, так и средними дозами ИИ – 250 и 100 мГр (Рисунок 17).

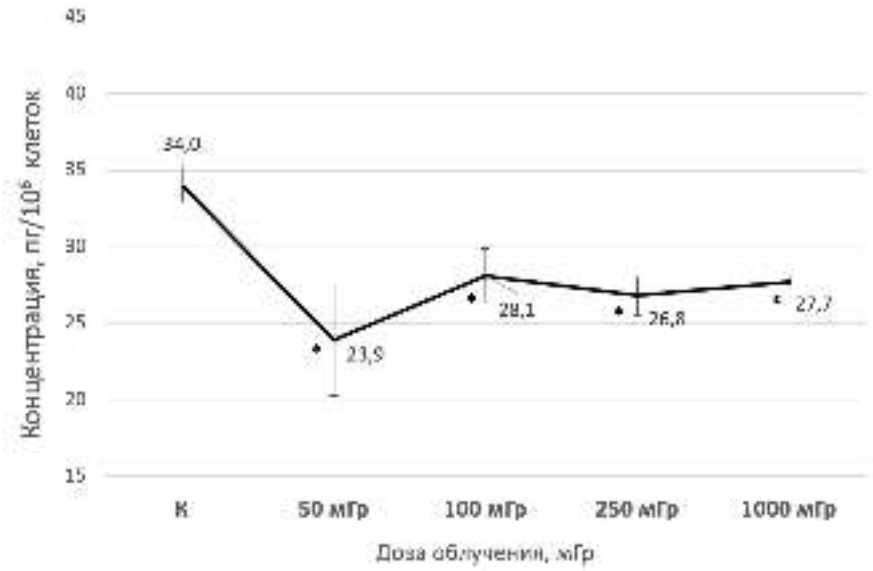


Рисунок 17. Зависимость концентрации ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 64 дня после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Также изменения наблюдались для концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах облученных МСК. Значения концентраций ИЛ-8 в кондиционированных средах исследуемых групп клеток во всех исследуемых временных точках представлены в Таблице 11.

Таблица 11. Концентрация ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.

Параметр	**К**	**50 мГр**	**100 мГр**	**250 мГр**	**1000 мГр**
	Концентрация ИЛ-8, пг/10^6 клеток				
48 часов	694,0±2,68	640,9±9,60*	544,3±34,77*	749,2±12,73*	819,1±29,19*
9 дней	753,6±6,77	476,5±2,82*	781,1±28,77	1042,0±90,23*	765,8±175,35
23 дня	177,7±12,91	160,0±9,19	174,8±11,37	185,7±0,00	156,7±5,95*
43 дней	226,1±11,92	202,6±1,03*	212,0±3,90	212,1±9,93	204,0±17,96
64 дня	132,9±10,37	113,9±26,25	98,8±4,23*	95,8±6,38*	107,0±2,82*

* (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 48 часов после облучения концентрация ИЛ-8 существенно снижалась в кондиционированных средах групп МСК, облученных малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр – 640,9±9,60 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 544,3±34,77 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно. В то же время для групп клеток, облученных средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр, наблюдалось повышение концентрации данного интерлейкина в кондиционированных средах – 749,2±12,73 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 819,1±29,19 пг/10^6 клеток ($p<0,05$). В целом, была отмечена зависимость доза-эффект (Рисунок 18).

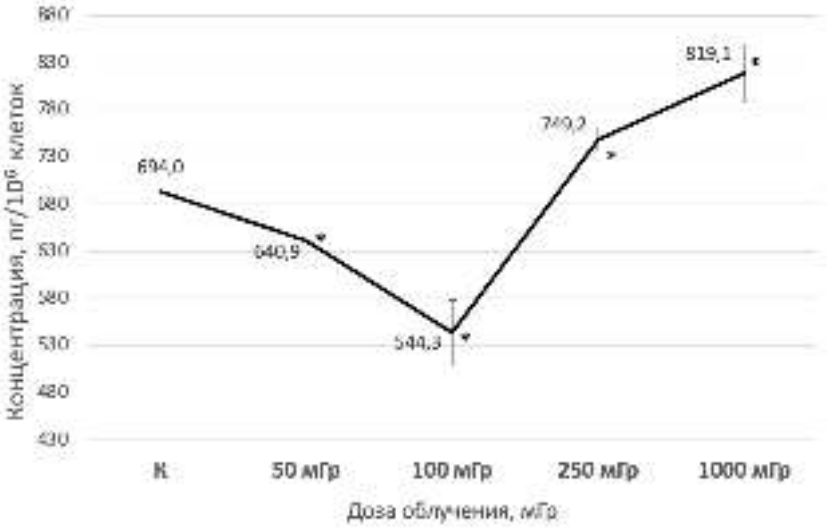


Рисунок 18. Зависимость концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 9 дней после облучения группа МСК, облученная в малой дозе ИИ 50 мГр, демонстрировала еще более существенное снижение концентрации ИЛ-8 в кондиционированной среде– 476,5±2,82 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), в то же время для группы клеток, облученной средней дозой ИИ 250 мГр, наблюдалось еще более существенное повышение концентрации ИЛ-8– 1042,0±90,23 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) (Рисунок 19). Концентрация ИЛ-8 для

групп МСК, облученных дозами 100 и 1000 мГр, оставалась сравнима с концентрацией необлучённой группы контроля.

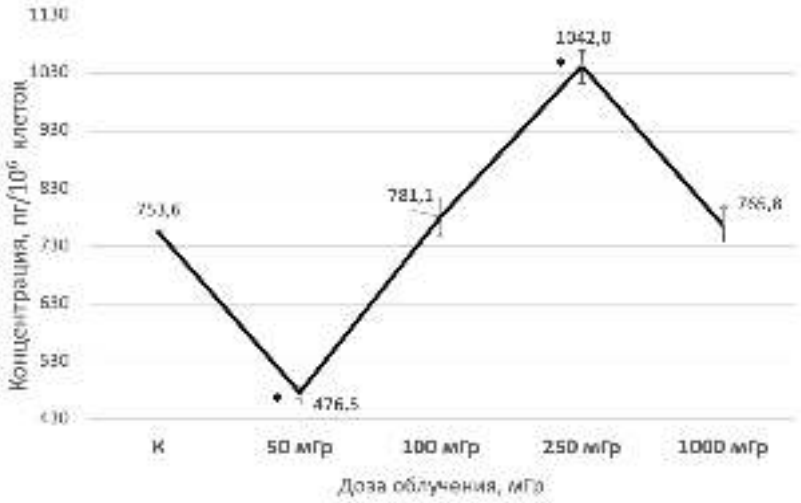


Рисунок 19. Зависимость концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 9 дней после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

В отдаленные сроки культивирования после облучения наблюдалось снижение концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах облученных клеток. Через 24 дня после облучения МСК, облученные средней дозой ИИ 1000 мГр, демонстрировали статистически достоверное снижение концентрации ИЛ-8 в кондиционированной среде – 156,7±5,95 пг/10^6 клеток. Также через 43 дня после облучения концентрация ИЛ-8 снижалась для группы МСК, облученной малой дозой ИИ 50 мГр – 202,6±1,03 пг/10^6 клеток (Рисунок 20).

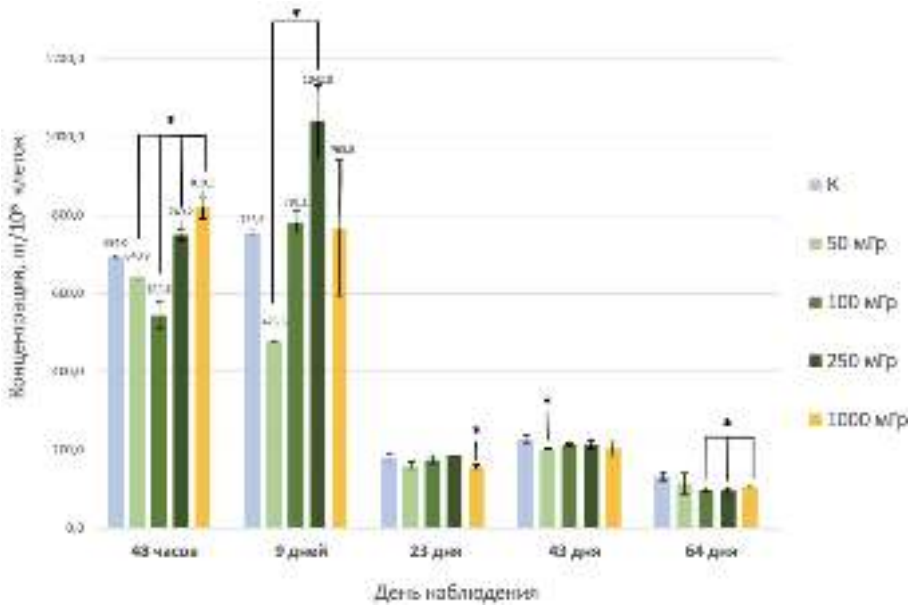


Рисунок 20. Концентрация ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 64 дня после облучения группы МСК, облученные малой и средними дозами ИИ 100, 250 и 1000 мГр, демонстрировали снижение концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах в сравнении с концентрацией необлученной группы контроля (Рисунок 21).

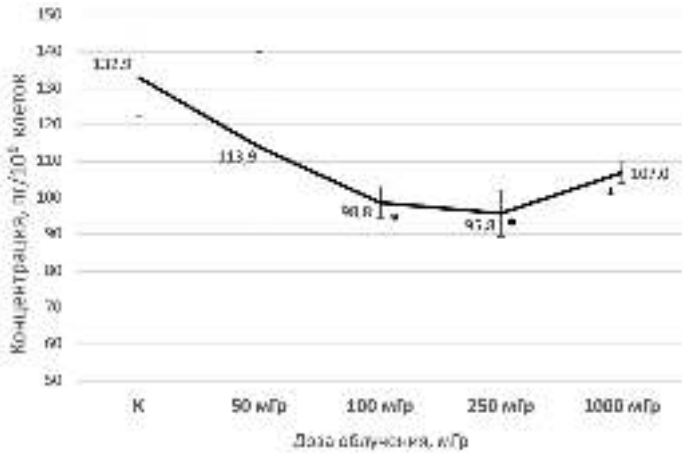


Рисунок 21. Зависимость концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 64 дня после облучения. * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Также изменения наблюдались для концентрации VEGF-A в кондиционированных средах облученных МСК. Значения концентраций VEGF-A в кондиционированных средах исследуемых групп клеток во всех исследуемых временных точках представлены в Таблице 12.

Таблица 12. Концентрация VEGF-A в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.

Параметр	**К**	**50 мГр**	**100 мГр**	**250 мГр**	**1000 мГр**
	Концентрация VEGF-A, пг/10^6 клеток				
48 часов	150,9±3,80	132,6±4,09*	196,1±6,91*	203,3±11,68*	199,1±45,70
9 дней	211,5±14,40	182,2±54,64	265,4±22,27*	233,8±18,84	101,5±28,04*
23 дня	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
43 дней	135,8±17,62	109,4±1,58*	116,8±10,15	104,9±32,50	161,7±69,76
64 дня	71,8±63,98	100,1±80,91	191,3±171,50	21,0±0,00	96,7±90,16

* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 48 часов после облучения наблюдались дозозависимые изменения концентрации VEGF-A в кондиционированной среде. Группа МСК, облученная малой дозой ИИ 50 мГр, демонстрировала снижение концентрации VEGF-A в кондиционированной среде – 132,6±4,09 пг/10^6 клеток ($p<0,05$). В то же время в группах МСК, облученных малой и средней дозой ИИ – 100 и 250 мГр наблюдалось повышение концентрации VEGF-A – 196,1±6,91 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 203,3±11,68 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно (Рисунок 22).

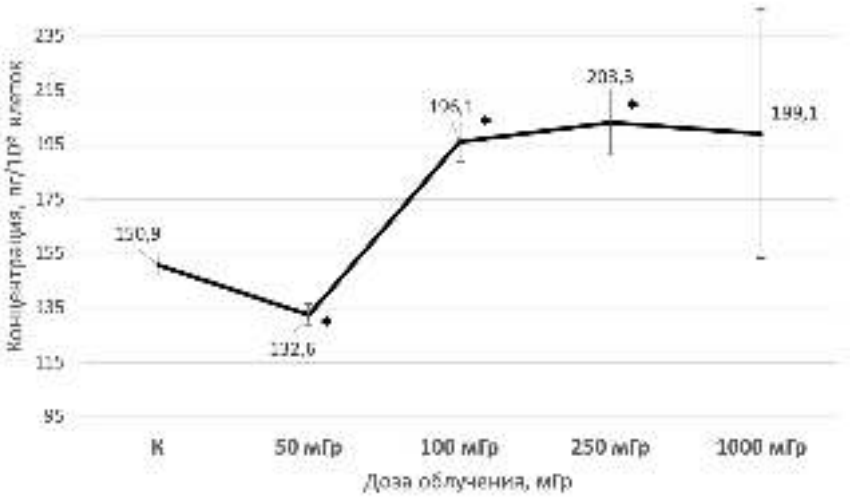


Рисунок 22. Зависимость концентрации VEGF-A в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Через 9 дней после облучения статистически достоверное повышенние концентрации VEGF-A относительно необлученной группы контроля сохранялось для МСК, облученных малой дозой ИИ 100 мГр – 265,4±22,27 пг/10^6 клеток ($p<0,05$). В тоже время группа МСК, облученная средней дозой ИИ 1000 мГр, демонстрировала снижение концентрации VEGF-A в кондиционированной среде – 101,5±28,04 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) (Рисунок 23).

В отдаленные сроки культивирования после облучения статистически достоверных различий для концентрации VEGF-A в кондиционированных средах исследуемых групп МСК обнаружено не было. Исключение составило снижение его концентрации в кондиционированной среде МСК через 43 дня после облучения малой дозой ИИ 50 мГр – 109,4±1,58 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) (Рисунок 23).

Наблюдаемое явление полного отсутствия VEGF-A в кондиционированных средах, полученных от необлученной группы контроля и групп МСК, облученных в малых и средних дозах ИИ 50, 100, 250 и 1000 мГр, через 23 дня после облучения, было подтверждено в исследованиях

двух независимых групп аликвот кондицинированных сред данной временной точки, полученных и криоконсервированных синхронно.

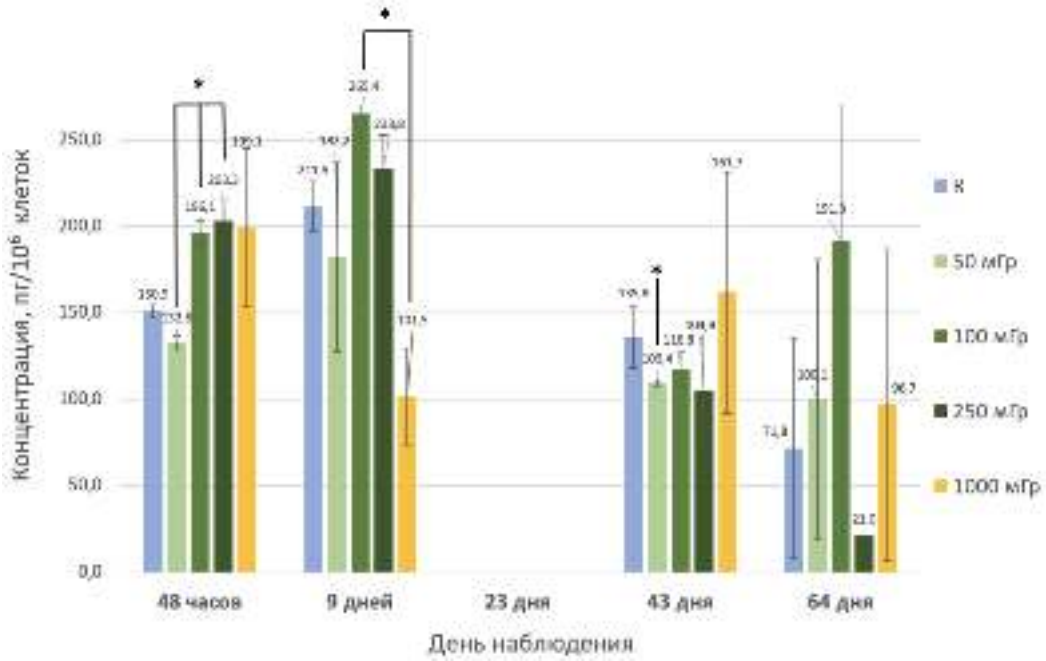


Рисунок 23. Концентрация VEGF-A в кондиционированных средах МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения.
* ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

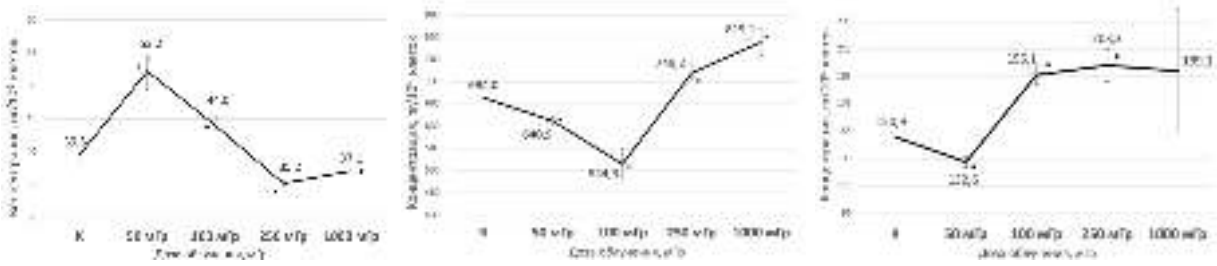
Таким образом, облучение как малыми, так и средними дозами ИИ оказывает влияние на экспрессию и секрецию растворимых факторов МСК слизистой ткани десны человека: ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF-A.

В целом, в исследовании секреторного профиля кондиционированных сред, полученных от облученных МСК слизистой ткани десны человека в нескольких временных точках на протяжении 64 дней культивирования, были показаны изменения в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения малыми и средними дозами ИИ. Подобные изменения позволяют косвенно судить об изменениях функциональной активности МСК, происходящих под влиянием ИИ.

Через 48 часов после облучения было выявлено статистически значимое повышение концентрации общего белка для групп МСК, облученных малыми и средней дозами ИИ – 50, 100 и 250 мГр, при этом для

группы клеток, облученной средней дозой 1000 мГр, это значение оставалось на уровне необлученной группы контроля, т.е. радиочувствительность МСК сменяется их радиорезистентностью. Вероятно, данные изменения указывают на стимулирующее действие облучения дозами 50, 100 и 250 мГр на экспрессию и секрецию белков, что находит подтверждение в работах других авторов [145,146]. Однако через 9 дней после облучения концентрация общего белка снижалась для всех облученных групп клеток в сравнении с необлученной группой контроля. И далее вплоть до 64 дня наблюдения изменений в концентрации общего белка в облученных группах МСК не детектировалось. Таким образом, можно предположить, что наблюдаемый стимулирующий эффект, развивающегося под влиянием облучения малыми и средней дозами ИИ 50, 100 и 250 мГр, носит временных характер и проявляется только на наиболее ранних сроках культивирования после облучения – 48 часов, после чего эффекты облучения малыми и средней дозами 50, 100 и 250 мГр становятся сравнимы с эффектами облучения средней дозой 1000 мГр.

Исследования качественного состава кондиционированных сред облученных и необлученной групп МСК слизистой ткани десны человека показали наличие в них таких факторов, как ИЛ-6, ИЛ-8 и VEGF-A, а также отсутствие ИЛ-10 и IDO на всем протяжении исследования – 64 дня. Интересно, что изменения в концентрациях ИЛ-6 (провоспалительный цитокин) и ИЛ-8 (хемокин, хемоаттрактант) носили противоположный характер, а именно: повышению концентрации ИЛ-6 сопутствовало снижение концентрации ИЛ-8 через 48 часов после облучения МСК малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр, в то же время противоположная закономерность наблюдалась для групп МСК, облученных средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр: снижению концентрации ИЛ-6 сопутствовало повышение концентрации ИЛ-8 (Рисунок 24 а, б).



(а) (б) (в)

Рисунок 24. (а) - зависимость концентрации ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения, (б) - зависимость концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения, (в) - зависимость концентрации VEGF-A в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения. * ($p<0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Выявленные закономерности можно объяснить вовлеченностью в регуляцию экспрессии как ИЛ-6, так и ИЛ-8 транскрипционных факторов NF-kB и AP-1, поскольку промоторы генов данных интерлейкинов содержат сайты связывания для них. Многие исследования ссылаются на возможную вовлеченность данных факторов в реализацию радиационного ответа клеток [61, 62, 94].

В современных исследованиях радиационно-индуцируемых изменений экспрессии и секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 под влиянием облучения большими дозами ИИ показано одновременное повышение экспрессии ИЛ-6 и ИЛ-8 [60, 61, 62, 91], однако в исследованиях эффектов, оказываемых облучением малыми дозами ИИ, нет единой прослеживаемой закономерности: с одной стороны, исследователи указывают на повышение экспрессии ИЛ-8 под влиянием малых доз ИИ [92], с другой – отсутствие изменений как для ИЛ-6, так и ИЛ-8 [147].

В представленном исследовании наблюдаемые закономерности изменения концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 под влиянием облучения в малых и

средних дозах могут быть объяснены, во-первых, особенностями радиочувствительности МСК слизистой ткани десны человека, видом и мощностью используемого ИИ, а во-вторых, вовлеченностью в регуляцию процессов экспрессии и секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 неочевидного фактора, активируемого под влиянием ИИ и оказывающего на них экспрессию и секрецию противоположное влияние: стимулирующее и ингибирующее, соответственно. В целом, на основании полученных результатов, можно сделать вывод о различии воспалительных реакций, реализуемых МСК слизистой ткани десны под влияем облучения в малых (50 и 100 мГр) и средних (250 и 1000 мГр) дозах рентгеновским излучения.

Результаты исследования VEGF-A, способного помимо регуляции процессов ангиогенеза оказывать иммуносупрессивное действие [117,118], вероятно, косвенно подтверждают наблюдаемые закономерности развития воспалительных реакций в ответ на облучение. Через 48 часов после облучения концентрация VEGF-A снижалась в группе МСК, облученной малой дозой ИИ 50 мГр (одновременно с повышением концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 и снижением хемоаттрактанта ИЛ-8), и в то же время повышалась в группе клеток, облученных в средней дозе ИИ 250 мГр (одновременно со снижением концентрации ИЛ-6 и повышением ИЛ-8) (Рисунок 24 в). Одновременное повышение концентрации ИЛ-8 и VEGF-A может быть обосновано вовлеченностью в процессы регуляции их экспрессии одного и того же регуляторного фактора, например, микроРНК miR-93 [148].

Неоднозначная ситуация наблюдается для группы МСК, облученных малой дозой ИИ 100 мГр, демонстрирующей одновременное повышение концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 и VEGF-A, способного оказывать иммуносупрессивное действие.

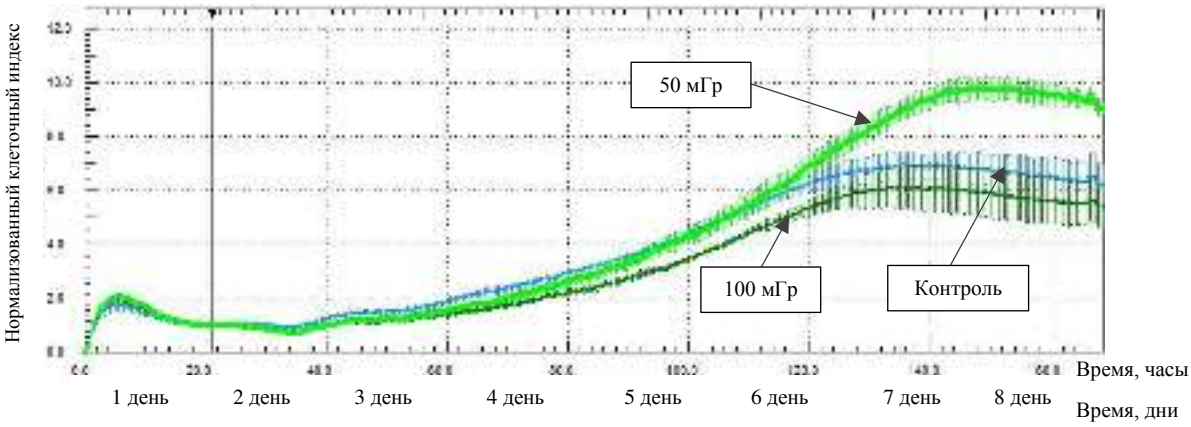
Важно, что в отдаленные сроки культивирования после облучения – через 43 и 64 дня, наблюдается снижение концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 для всех облученных групп клеток, т.е. как и в случае с изменениями,

наблюдаемыми для концентрации общего белка, можно предположить, что стимулирующий эффект, развивающийся под влиянием ИИ, носит временный характер и проявляется только в наиболее ранние сроки культивирования после облучения. В отдаленные же сроки снижение концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 для всех облученных групп МСК может косвенно свидетельствовать о развивающейся радиационно-индуцированной геномной нестабильности, приводящей к снижению их функциональной и иммуномодулирующей активности.

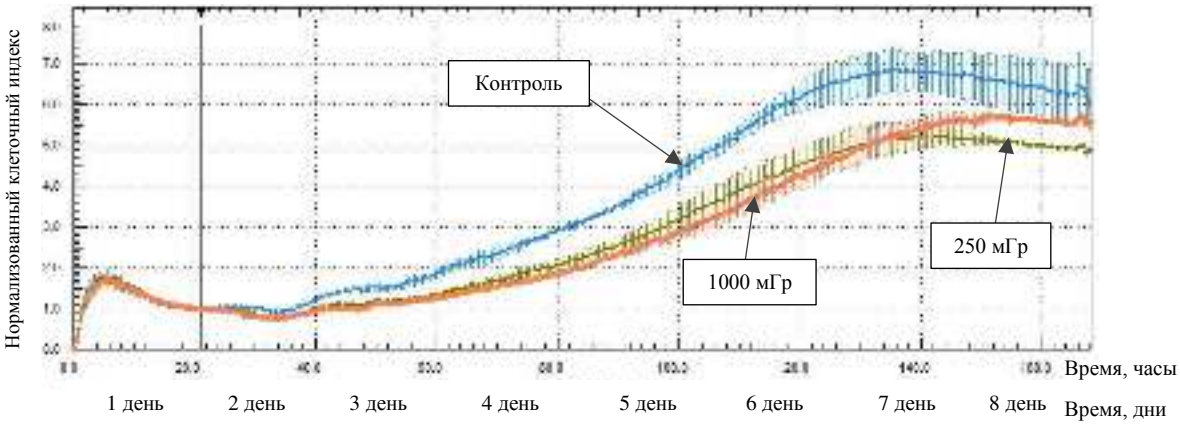
3.3. Изменения пролиферативной активности и состава клеточных поколений МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения

Оценка пролиферативной активности МСК осуществлялась с 1, 9, 16, 23, 35, 43 и 64 дня после облучения, каждое исследование продолжалось 170 часов. Точка нормализации данных для каждого исследования – 21 час после начала эксперимента.

В исследовании с 1 дня после облучения было отмечено усиление пролиферативной активности группы МСК, облученной малой дозой ИИ 50 мГр: статистически значимое увеличение значения НКИ отмечалось вплоть до 160 часа после облучение – 9,4±0,36 ($p<0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – 6,4±0,75 (Рисунок 25 а). В то же время для групп МСК, облученных в дозах 100, 250 и 1000 мГр наблюдалось снижение пролиферативной активности: снижение значения НКИ отмечалось вплоть до 120 часа после облучения малой дозой ИИ 100 мГр – 5,3±0,30 ($p<0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – 6,1±0,34, до 165 часа после облучения средней дозой ИИ 250 мГр – 5,0±0,02 ($p<0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – 6,4±0,75, и до 145 часа после облучения средней дозой ИИ 1000мГр – 5,2±0,18 ($p<0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – 6,7±0,54 (Рисунок 25 б).



(а)



(б)

Рисунок 25. Динамика пролиферативной активности МСК с 1 дня после облучения в дозах: (а) – 50мГр (светло-зеленый) и 100мГр (темно-зеленый), (б) – 250мГр (зеленый) и 1000мГр (оранжевый).

В исследовании состава клеточных поколений через 24 (1 день), 48 (2 день), 72 (3 день) и 96 (4 день) часов после облучения (Таблица 13), было отмечено статистически значимое увеличение количества клеток со сниженной интенсивностью флуоресценции в группе МСК, облученной малой дозой ИИ 100 мГр, через 3 и 4 дня после облучения (Рисунок 26). Подобные изменения могут указывать на появление в составе популяции МСК, облученной малой дозой ИИ 100 мГр, субпопуляции клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности.

Таблица 13. Количество МСК со сниженной интенсивностью флуоресценции в день облучения (0 день) и через 1, 2, 3 и 4 дня после облучения.

Параметр	**К**	**50мГр**	**100мГр**	**250мГр**	**1000мГр**
	Количество клеток, %				
0 день	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
1 день	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
2 день	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
3 день	2,3±0,71	2,6±0,50	9,0±0,83*	2,2±0,45	3,0±0,61
4 день	4,2±0,45	5,3±0,52	13,2±1,53*	4,5±0,55	5,3±0,65

*(p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

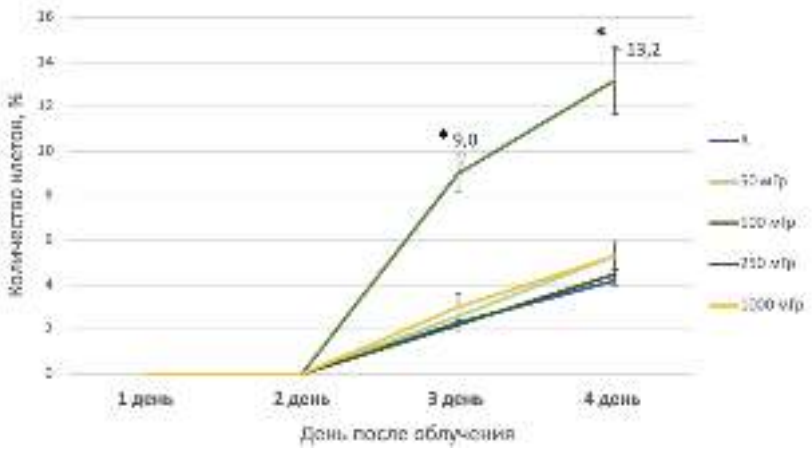


Рисунок 26. Количество МСК со сниженной интенсивностью флуоресценции через 3 и 4 дня после облучения. *(p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

В исследовании с 9 дня после облучения также было отмечено усиление пролиферативной активности группы МСК, облученной малой дозой ИИ 50 мГр: статистически значимое увеличение значения НКИ отмечалось вплоть до 160 часа после облучение – 7,4±0,77 (p<0,05) в сравнении с необлученной группой контроля – 4,3±0,53 (Рисунок 27). В то же время для групп МСК, облученных в дозах 100, 250 и 1000 мГр,

интенсивность пролиферативная активность оставалась сравнима с необлученной группой контроля.

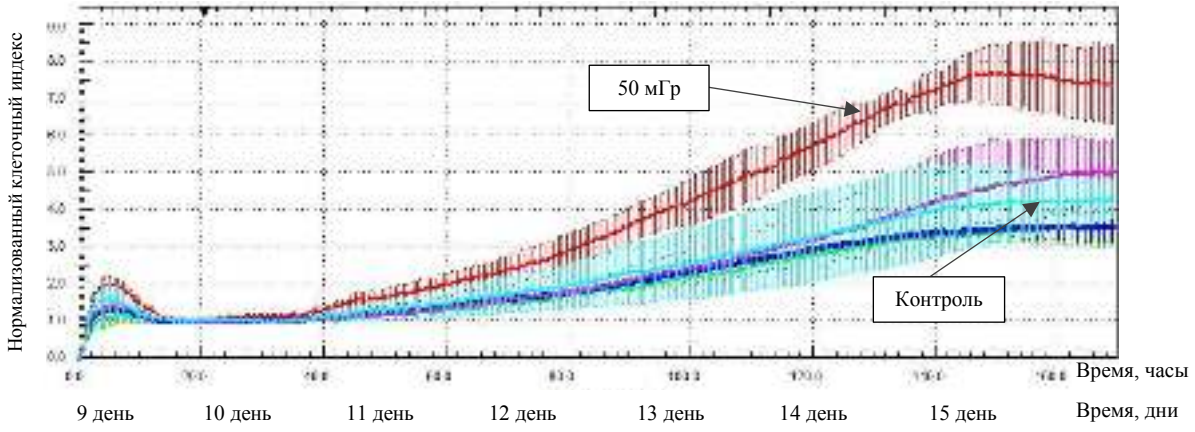


Рисунок 27. Динамика пролиферативной активности МСК с 9 дня после облучения в дозах: 50 мГр (красный), 100 мГр (розовый), 250 мГр (зеленый) и 1000 мГр (синий).

В исследованиях с 16 и 23 дня после облучения статистически значимых различий в динамике пролиферативной активности групп облученных МСК в сравнении с необлученной группой контроля не было обнаружено вплоть до 170 часа после облучения.

В исследовании с 35 дня после облучения было отмечено снижение пролиферативной активности для всех облученных групп МСК в сравнении с необлученной группой контроля (Рисунок 28). Снижение значений НКИ отмечалось вплоть до 170 часа после облучение в малых и средних дозах ИИ 50 мГр – 6,3±2,46 ($p<0,05$), 100 мГр – 8,3±1,46 ($p<0,05$), 250 мГр – 5,2± 0,50 ($p<0,05$), 1000 мГр – 5,6±0,24 ($p<0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – 17,2±3,57.

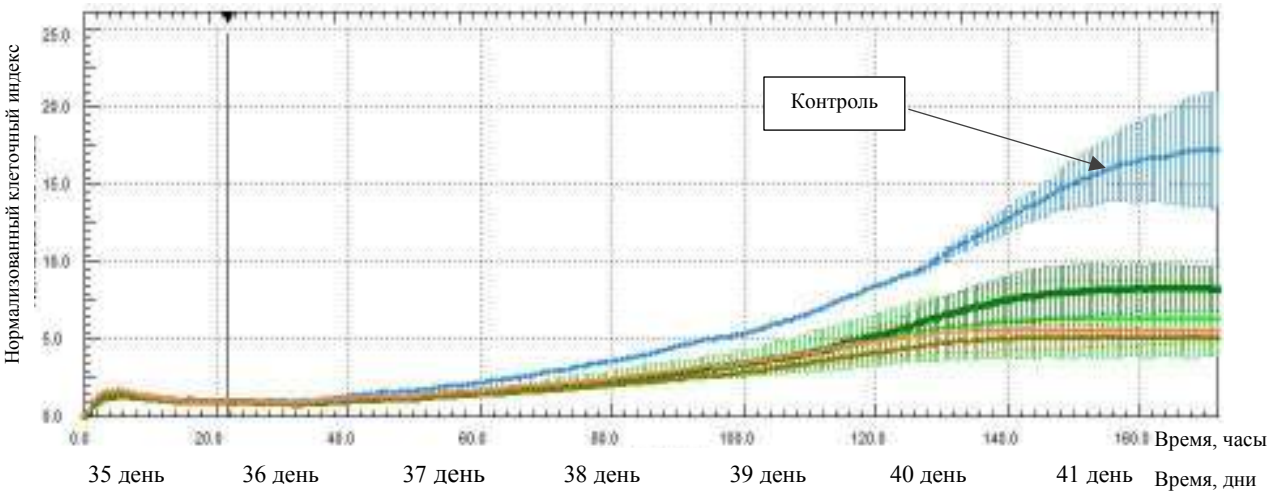


Рисунок 28. Динамика пролиферативной активности МСК с 35 дня после облучения в дозах 50мГр (светло-деленый), 100мГр (темно-зеленый), 250мГр (зеленый) и 1000мГр (оранжевый).

В исследовании состава клеточных поколений через 29, 30, 31 и 32 после облучения, было отмечено статистически значимое увеличение количества клеток со сниженной интенсивностью флуоресценции в группах МСК, облученных малой и средней дозами ИИ 50 и 250 мГр (Таблица 14, Рисунок 28). Подобные изменения могут указывать на появление в составе популяций МСК, облученных малой и средней дозами ИИ 50 и 250 мГр, отдельных клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности. При этом МСК, облученные средней дозой 1000 мГр, характеризовалась снижением количества клеток со сниженной интенсивностью флуоресценции (Рисунок 29).

Таблица 14. Количество МСК со сниженной интенсивностью флуоресценции через 29, 30, 31 и 32 дня после облучения.

	К	**50мГр**	**100мГр**	**250мГр**	**1000мГр**
	Количество клеток, %				
29 день	0,8±0,21	3,4±0,51*	1,6±0,63	5,0±0,85*	0,5±0,05
30 день	1,5±0,35	4,9±0,42*	2,2±0,80	8,0±0,65*	0,8±0,25
31 день	4,2±0,71	8,6±0,70*	4,7±0,53	13,1±0,95*	2,5±0,51*
32 день	5,6±0,15	13,6±0,25*	7,0±0,30*	24,4±1,55*	3,5±0,65*

* (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

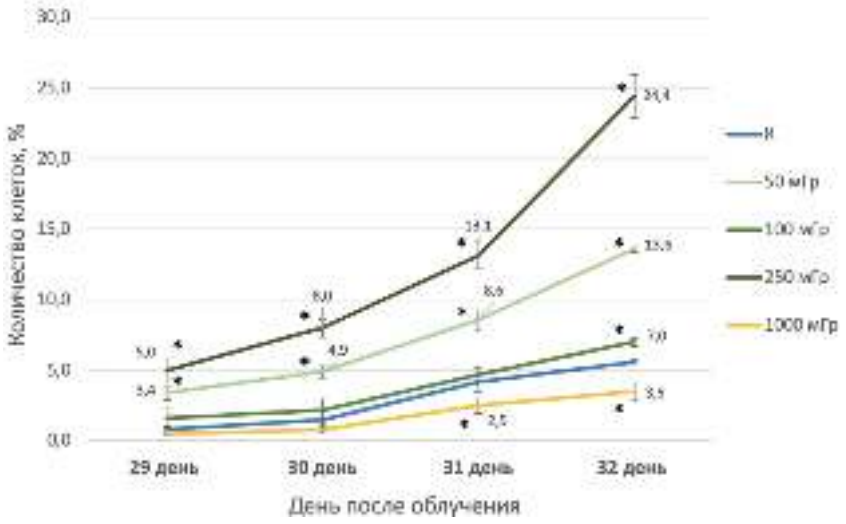
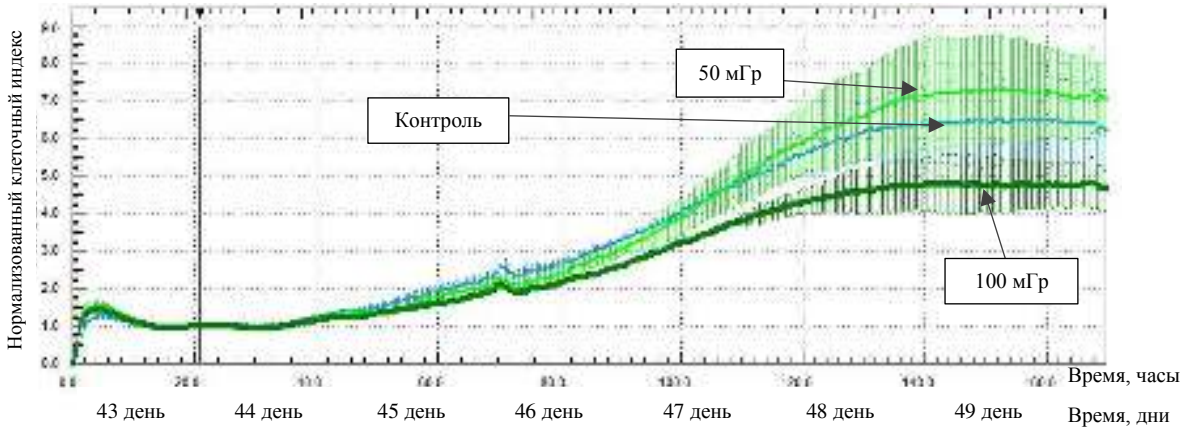


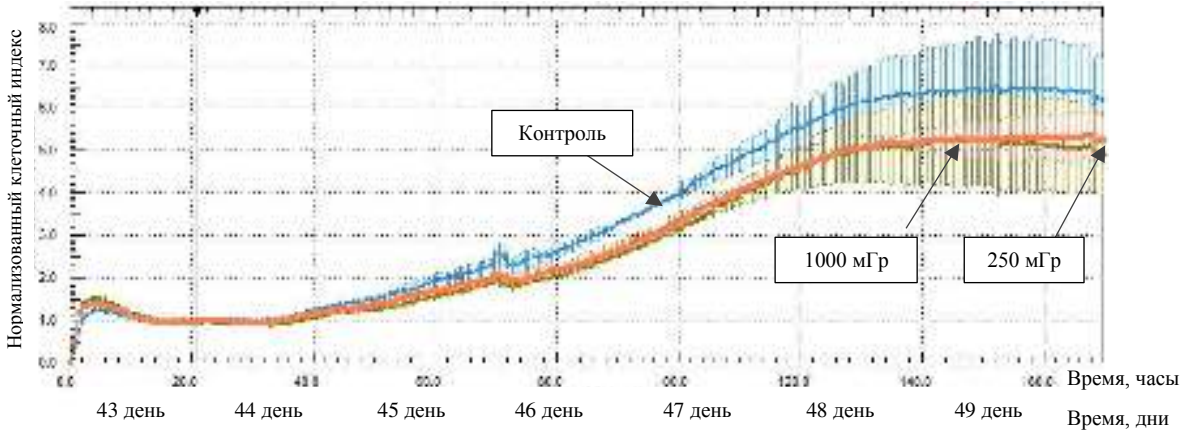
Рисунок 29. Количество МСК со сниженной интенсивностью флуоресценции через 29, 30, 31 и 32 дня после облучения (п/о). * (p<0,05) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

В исследовании с 43 дня после облучения было отмечено снижение пролиферативной активности для групп МСК, облученных малой и средними дозами ИИ 100, 250 и 1000 мГр: снижение значений НКИ отмечалось вплоть до 130 часа после облучения малой дозой ИИ 100 мГр – 4,5±0,58(p<0,05) в сравнении с группой контроля – 6,1± 0,83 (Рисунок 30 а), до 110 часа после облучения средними дозами ИИ 250 мГр – 3,9±0,22 (p<0,05) и 1000 мГр –

4,0±0,20 (p<0,05) в сравнении с необлученной группой контроля – 4,8±0,35 (Рисунок 30 б).



(а)



(б)

Рисунок 30. Динамика пролиферативной активности МСК с 43 дня после облучения в дозах: (а) – 50мГр (светло-зеленый) и 100мГр (темно-зеленый), (б) – 250мГр (зеленый) и 1000мГр (оранжевый).

В исследовании с 64 дня после облучения достоверно значимых различий в динамике пролиферативной активности групп облученных МСК в сравнении с необлученной группой контроля обнаружено не было вплоть до 170 часа после облучения.

Таким образом, в исследовании пролиферативной активности облученных МСК слизистой ткани десны человека был отмечен стимулирующий эффект облучения малой дозы ИИ 50 мГр в ранние сроки

культивирования (исследование с 1 по 15 день). Группы МСК, облученные малой и средними дозами ИИ 100, 250 и 1000 мГр, напротив, демонстрировали снижение пролиферативной активности (исследование с 1 по 15 день). В то же время в исследовании состава клеточных поколений через 3 и 4 дня после облучения МСК малой дозой ИИ 100 мГр было обнаружено появление отдельных клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности – 9,0±0,83% ($p<0,05$), данное явление не нашло подтверждения в исследовании пролиферативной активности на приборе xCelligence RTCA. Вероятно, что доза 100 мГр стимулирует не всю популяцию облучаемых клеток, а лишь ее небольшую часть, усиленная пролиферация которой не отражается на результатах исследования общей интенсивности пролиферативной активности на приборе xCelligence RTCA, детектирующего динамику изменения площади, занимаемой клетками на дне лунки (НКИ), однако может быть зафиксирована методом проточной цитофлуориметрии благодаря ускоренной потере данными клетками флуоресцентного красителя.

В исследовании с 16 дня после облучения статистически значимых различий в пролиферативной активности необлученных и облученных МСК не отмечалось. Данное явление может быть объяснено успешным нивелированием популяцией МСК функциональных изменений, возникающих в результате облучения малыми и средними дозами ИИ

В исследовании с 35 дня после облучения все облученные группы клеток в той или иной мере проявляли снижение пролиферативной активности в сравнении с необлученной группой контроля. В то же время в исследовании состава клеточных поколений с 29 дня после облучения в группах МСК, облученных малой и средней дозами ИИ 50 и 250 мГр, обнаружено появление отдельных клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности. На 32 день после облучения статистически значимое увеличение количества клеток с повышенной интенсивностью пролиферации было также обнаружено в группе 100 мГр. Описываемые

явления также не нашли подтверждения в исследованиях пролиферативной активности клеток на приборе xCelligence RTCA. Однако, угнетающий эффект облучения средней дозой 1000 мГр был зафиксирован как в исследовании пролиферативной активности, так и в исследовании состава клеточных поколений.

В исследовании с 64 дня после облучения все облученные групп клеток демонстрировали пролиферативную активность сравнимую с необлученной группой контроля, однако был отмечен эффект облучения малой дозой ИИ 50 мГр – пролиферативная активность данной группы облученных клеток выравнивалась с контрольной группой уже в исследовании с 43 дня, тогда как группы МСК, облученных малой и средними дозами ИИ 100, 250 и 1000 мГр продолжали демонстрировать снижение пролиферативной активности.

В целом, можно сделать вывод, что облучение малой дозой ИИ 50 мГр в ранние сроки культивирования после облучения оказывает стимулирующий эффект на пролиферативную активность МСК слизистой ткани десны. Данное явление находит отражение в работах других авторов, указывающих на вовлеченность в данный процесс сигнального пути MAPK/ERK [115]. В отдаленные сроки описываемое явление затухает, и эффекты малых доз радиации становятся сравнимы с эффектами облучения средними дозами, приводя к угнетению пролиферации. В наиболее отдаленный срок культивирования после облучения – исследование с 64 дня, влияние облучения малыми и средними дозами ИИ и вовсе не отражается на динамике пролиферативной активности клеток, при этом вновь отмечается эффект облучения малой дозой 50 мГр – группа клеток, облученная данной дозой ИИ быстрее выравнивается по интенсивности пролиферативной активности с необлученной группой контроля.

Описываемое явление увеличения количества клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности в общей популяции МСК в ответ на облучение малыми и средней дозой ИИ 50, 100 и 250 мГр в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения может быть объяснено

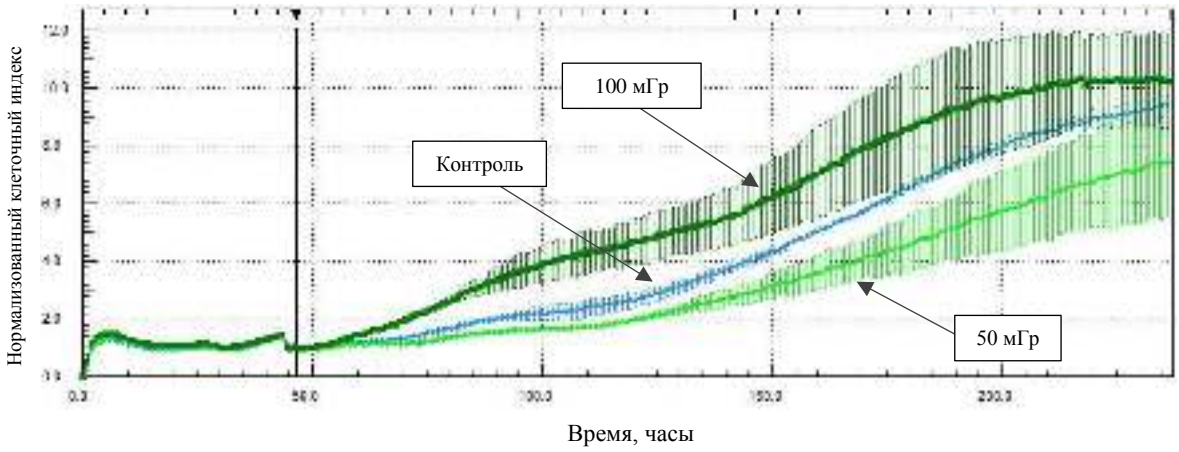
тем фактом, облучаемая клеточная популяция, находящаяся в логарифмической фазе рост, гетерогенна (не синхронизирована), т.е. ее члены находятся в разных фазах клеточного цикла, что вероятно может приводить к развитию различных ответных реакций у клеток в одной исследуемой популяции в ответ на облучение. Данное явление не находит подтверждения в исследовании пролиферативной активности на приборе xCelligence RTCA. Вероятно, это связано с тем, что вклад данных клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности в общую конфлюентность МСК на дне лунки культурального планшета невелик, поэтому не отражается на значениях сопротивления, измеряемого на приборе xCelligence RTCA. При этом в отдаленные сроки культивирования после облучения МСК средней дозой ИИ 1000 мГр, снижение количества клеток с повышенной пролиферативной активностью находило отражение в снижение пролиферативной активности, детектируемой на приборе xCelligence RTCA.

В целом, явление снижения пролиферативной активности МСК под воздействием облучения малыми и средними дозами ИИ в отдаленные сроки культивирования может косвенно свидетельствовать о развивающейся радиационно-индуцированной геномной нестабильности, приводящей к снижению их функциональной и иммуномодулирующей активности, выражающейся также в описанном ранее снижении концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8.

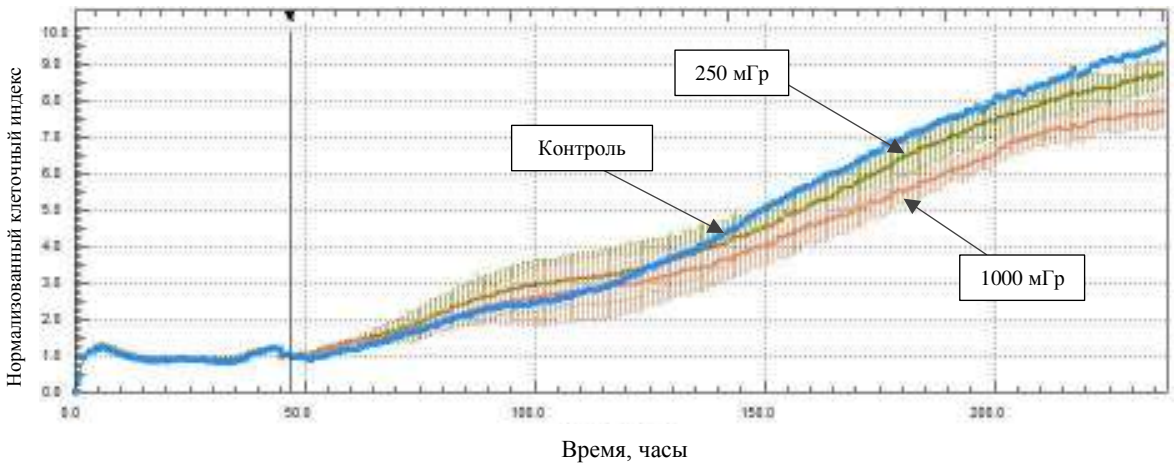
3.4. Изменения пролиферативной активности необлученных МСК при их культивировании в кондиционированных средах, полученных от облученных МСК в ранние и отдаленные сроки культивирования после облучения

В лунки культурального планшета с необлученными МСК слизистой ткани десны вносилась кондиционированная среда, полученная от облученных культур МСК (дозы облучения 50, 100, 250 и 1000мГр) во временных точках – 48 часов, 9, 24, 43 и 64 дня после облучения. Каждое исследование пролиферативной активности продолжалось 235 часов. Группой контроля являлись необлученные МСК слизистой ткани десны, культивируемые в кондиционированной среде необлученной группы контроля. Точка нормализации данных – 48 часов после начала эксперимента.

Было показано, что кондиционированная среда, полученная через 48 часов после облучения МСК слизистой ткани десны малой дозой ИИ 100 мГр, приводит к усилению пролиферативной активности необлученных МСК (Рисунок 31 а). Увеличение значений НКИ отмечалось вплоть до 175 часов после внесение кондиционированной среды – 7,0±1,71 ($p<0,05$) в сравнении с группой контроля – 4,9±0,00.



(а)



(б)

Рисунок 31. Динамика пролиферативной активности необлученных МСК при их культивировании в кондиционированных средах МСК, полученных через 48 часов после облучения клеток в дозах: (а) – 50 мГр (светло-зеленый) и 100 мГр (темно-зеленый), (б) - 250 мГр (зеленый) и 1000 мГр (оранжевый).

При этом кондиционированные среды, полученные через 48 часов после облучения МСК слизистой ткани десны малой и средними дозами 50, 250 и 1000 мГр, приводили к снижению пролиферативной активности необлученных МСК (Рисунок 31 а, б). Снижение значений НКИ отмечалось после внесение кондиционированных сред от клеток, облученных дозами ИИ: 50 мГр – 6,0±1,51 ($p<0,05$) в сравнении с группой контроля – 8,2±0,23 (до 220 часов), 250 мГр – 8,2±0,37 ($p<0,05$) в сравнении с группой контроля – 8,9±0,15 (до 224 часов), 1000 мГр – 4,8±0,62 ($p<0,05$) в сравнении с группой контроля – 5,9±0,40 (до 165 часов).

Дальнейшие исследования кондиционированных сред, полученных через 9 дней после облучения от МСК слизистой ткани десны, также показали, что кондиционированная среда МСК, облученных малой дозой ИИ 100 мГр, приводит к усилению пролиферативной активности необлученных клеток (Рисунок 32). Увеличение значений НКИ отмечалось вплоть до 227 часов после внесение кондиционированной среды – 6,7±0,31 ($p<0,05$) в

сравнении с группой контроля – 5,6±0,2. Для остальных групп кондиционированных сред, полученных от облученных клеток (50, 250 и 1000 мГр) уровень пролиферативной активности необлученных клеток оставался на уровне группы контроля.

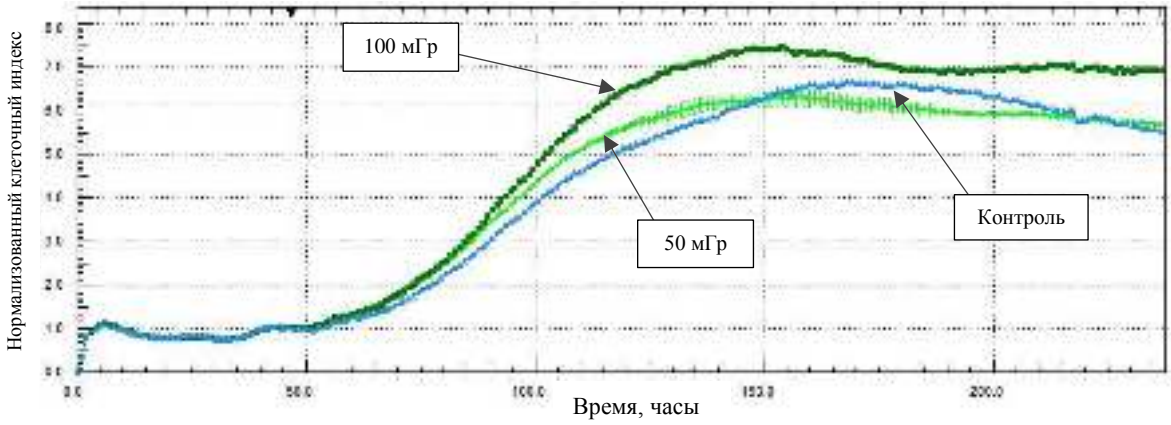


Рисунок 32. Динамика пролиферативной активности необлученных МСК при их культивировании в кондиционированных средах МСК, полученных через 9 дней после облучения клеток в дозах 50 мГр (светло-зеленый) и 100 мГр (темно-зеленый).

В исследованиях пролиферативной активности необлученных МСК слизистой ткани десны, культивируемых в кондиционированных средах, полученных от МСК через 16, 24, 43 и 64 дня после облучения в дозах 50, 100, 250 и 1000 мГр, статистически значимых изменений обнаружено не было.

Таким образом, в исследовании изменений пролиферативной активности необлученных МСК слизистой ткани десны человека под влиянием факторов кондиционированных сред был отмечен стимулирующий эффект кондиционированной среды, полученной от МСК через 48 часов после облучения малой дозой ИИ 100 мГр – пролиферативная активность усиливалась. Аналогичный эффект усиления пролиферативной активности наблюдался под влиянием факторов кондиционированных сред, полученных от МСК через 9 дней после облучения также малой дозой ИИ 100 мГр. В то

же факторы кондиционированных сред, полученных от МСК через 48 часов после облучения в дозах 50, 250 и 1000 мГр, приводили к снижению пролиферативной активности необлученных МСК слизистой ткани десны человека.

Изменения функциональных свойств необлученных клеток под влиянием факторов кондиционированных сред, полученных от облученных клеток, описано в литературе и рассматривается в качестве явления эффекта свидетеля. В основе данного эффекта лежит передача сигналов необлученным клеткам (клеткам-свидетелям) от облученных клеток за счет выделения ими различных факторов, образованных после непосредственного воздействия на клетки ИИ, приводящего к повреждениям молекул, мембран и целых органелл. Секреторные факторы могут высвобождаться клетками самостоятельно [134] или в составе экзосом [135, 136].

Чаще всего авторы указывают на развитие в клетках-свидетелях негативных последствий, таких же как таких как двунитевые разрывы ДНК, образование активных форм кислорода и т.д., влекущих за собой радиационный канцерогенез [132]. В целом, эффекты, наблюдаемые в клетках-свидетелях, должны отражать изменения, происходящие в облученных клетках. Результаты представленного исследования демонстрируют подобную закономерность для облучения средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр: снижение пролиферативной активности МСК облученных средними дозами ИИ, на ряду со снижение пролиферативной активности необлученных МСК под влиянием факторов кондиционированных сред, полученных от МСК через 48 часов после облучения указанными дозами.

Динамика пролиферативной активности МСК, облученных малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр не соотносится с изменениями, наблюдаемыми для необлученных клеток под влияние факторов кондиционированных сред, полученных от МСК после облучения указанными дозами.

Усиление пролиферативной активности отмечено для МСК, облученных малой дозой ИИ 50 мГр, однако факторы кондиционированных сред, полученных от данной группы клеток приводят к снижению пролиферативной активности необлученных клеток. В исследовании Mothersill и соавт. было выдвинуто предположение, что биологический смысл эффектов, оказываемых факторами кондиционированных сред, полученных от МСК, облученных малыми дозами ИИ, может заключается в элиминации уже поврежденных клеток из популяции [149], как стимулируя необлученные клетки к подготовке к возможному облучению в будущем. Кроме того, в работах Mothersill и соавт. отмечено, что кондиционированные среды, полученные от клеток, облученных малыми дозами ИИ, как и само облучение, могут приводить к развитию адаптивного ответа при повторном облучении большими дозами [150].

В то же время облучение МСК малой дозой ИИ 100 мГр приводит снижению пролиферативной активности, однако факторы кондиционированной среды, полученной от данной групп клеток через 48 часов после обучения, усиливают пролиферативную активности необлученных МСК. Вероятно, это может быть связано с появлением в составе популяции МСК, облученных малой дозой ИИ 100 мГр, отдельных клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности.

Таким образом, эффекты, оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК, облученных малыми дозами ИИ, отличаются от таковых для факторов кондиционированных сред, полученных от МСК, облученных средними дозами ИИ.

Факторы кондиционированных сред, полученных в отдаленные сроки культивирования после облучения МСК как малыми 50 и 100 мГр, так и средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр не приводят к изменениям пролиферативной активности необлученных клеток, что может говорить о том, что в отдаленные сроки культивирования облученные клетки перестают секретировать факторы, образование которых опосредовано влиянием ИИ.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с поставленной целью исследования было изучено влияние облучения малыми (50 и 100 мГр) и средними (250 и 1000 мГр) дозами рентгеновского излучения, а также кондиционированных сред, полученных от облученных клеток, на МСК слизистой ткани десны человека в ранние и отдаленные сроки культивирования после воздействия. Исследование проводилось на биологической модели охарактеризованной культуры МСК человека, полученной от не персонифицированного донора слизистой ткани десны и культивируемой в среде MesenCult с добавлением стандартизированного коммерческого соплемента (STEMCELL Technologies, Канада), что позволило минимизировать влияние условий культивирования на оцениваемые эффекты облучения. Длительное культивирование МСК осуществлялось непрерывно на протяжении всего исследования – 64 дня (до 12 пассажа).

Изучение изменений, происходящих в функциональной активности МСК под влиянием облучения малыми и средними дозами ИИ, особенно важно, поскольку в организме человека они выполняют роль регенеративного резерва, обладая способностью к самоподдержанию и потенциями к дифференцировке. Исследование секреторного профиля, профиля поверхностных АГ и пролиферативной активности МСК позволяет судить об изменениях их функциональных свойств.

В исследовании экспрессии поверхностных антигенов МСК были обнаружены дозозависимые изменения уровня экспрессии поверхностных АГ CD117 и CD90, происходящие под влиянием облучения в дозах 50, 100 и 250 мГр и отражающие явление смены радиочувствительности радиорезистентностью – клетки, изначально чувствительные к облучению, с повышением дозы становятся устойчивыми к повреждающему действию радиации. На основании уровней экспрессии поверхностных АГ МСК можно судить об изменениях их функциональных свойств, в частности, дифференцировочного потенциала (обнаружены изменения экспрессии

CD90, CD73, CD105). Благодаря доступности и стандартизации метода проточной цитофлуориметрии, экспрессия поверхностных антигенов МСК, может быть предложена в качестве критерия оценки эффектов, развивающихся под влиянием облучения малыми и средними дозами ИИ.

В исследовании секреторного профиля в ранние сроки культивирования после облучения было обнаружено стимулирующее действие облучения малыми и средней дозой ИИ 50, 100 и 250 мГр – повышение концентрации общего белка в кондиционированных средах, полученных от облученных МСК. Также облучение малыми и средними дозами ИИ приводило к развитию противоположных воспалительных реакций: облучение в дозах 50 и 100 мГр повышало концентрацию провоспалительного цитокина ИЛ-6 и снижало концентрацию хемокина ИЛ-8 в кондиционированных средах, в то время как после облучение в дозах 250 и 1000 мГр наблюдалась обратная закономерность: снижение ИЛ-6 и повышение ИЛ-8. Важно, что в отдаленные сроки культивирования после облучения наблюдалось снижение концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 для всех облученных групп клеток, что косвенно может свидетельствовать о развивающейся радиационно-индуцированной геномной нестабильности, приводящей к снижению функциональной и иммуномодулирующей активности МСК слизистой ткани десны.

В исследовании пролиферативной активности в ранние сроки культивирования после облучения был обнаружен стимулирующий эффект облучения малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр: облучение дозой 50 мГр приводило к усилению пролиферативной активности МСК (с 1 по 15 день), в свою очередь облучение дозой 100 мГр приводило к увеличению в облученной популяции МСК количества клеток с усиленной пролиферативной активностью (через 3 и 4 дня). В отдаленные сроки культивирования после облучения пролиферативная активность всех облученных групп МСК снижалась, что в контексте ранее описанного снижения концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 может также свидетельствовать о

развивающейся радиационно-индуцированной геномной нестабильности клеток.

В исследовании пролиферативной активности необлученных МСК, культивируемых в кондиционированных средах, полученные от облученных клеток, было показано, что эффекты, оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК на ранних сроках культивирования после облучения малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр, отличаются от эффектов оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК на ранних сроках культивирования после облучения средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр. Факторы кондиционированных сред, полученных от МСК в отдаленные сроки культивирования после облучения как малыми, так и средними дозами ИИ, не оказывают влияния на пролиферативную активность необлученных клеток.

В целом, культура клеток МСК слизистой ткани десны человека демонстрирует дозозависимые функциональные изменения под влиянием облучения в малых и средних дозах ИИ и благодаря своей биологической доступности (малой инвазивности процедуры получения биоматериала для выделения клеток), простоты выделения и стабильности получаемой клеточной линии представляется удобной моделью для изучения эффектов, оказываемых ионизирующим излучением, и в будущем может быть предложена для оценки индивидуальной радиочувствительности человека.

ВЫВОДЫ

1. Поверхностные антигены МСК являются перспективным критерием оценки последствий воздействия ИИ в ранние периоды культивирования после облучения. Показано, что экспрессия поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны человека (CD117, CD90, CD73, CD105, CD44) изменяется под воздействием облучения в дозах 50, 100 и 250 мГр в ранние сроки культивирования после облучения (до 16 дней). Наблюдаемые изменения могут указывать на изменения функциональной активности клеток.

2. Показано, что концентрация общего белка в кондиционированной среде увеличивается в ранний период культивирования после облучения (48 часов) МСК в дозах 50, 100 и 250 мГр. Исследуемые малые и средние дозы ИИ приводят к развитию противоположных воспалительных реакций: облучение малыми дозами 50 и 100 мГр приводит к повышению концентрации ИЛ-6 – 52,2±2,75 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 44,0±0,74 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно, и снижению концентрации ИЛ-8 – 640,9±9,60 пг/10^6 клеток ($p<0,05$) и 544,3±34,77 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно, в то время как облучение средними дозами 250 и 1000 мГр приводит к снижению концентрации ИЛ-6 – 35,2±0,56 пг/10^6 клеток и 37,1±0,00 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно, и повышению концентрации ИЛ-8 – 749,2±12,73 пг/10^6 клеток и 819,1±29,19 пг/10^6 клеток ($p<0,05$), соответственно. В отдаленные сроки культивирования после облучения (43 и 64 день) для всех исследуемых облученных групп МСК показано снижение концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 в кондиционированной среде, свидетельствующее об угнетении их функциональной иммуномодулирующей активности под влиянием малых и средних доз ИИ.

3. В ранние сроки культивирования после облучения выявлены стимулирующие эффекты облучения малыми дозами 50 и 100 мГр: облучение в дозе 50 мГр приводит к усилению пролиферативной активности МСК (с 1 по 15 день), облучение в дозе 100 мГр приводит к увеличению в

облученной популяции МСК количества клеток с усиленной пролиферативной активностью (через 4 дня) – 13,2±1,53% ($p<0,05$). В отдаленные сроки культивирования после облучения пролиферативная активность всех облученных групп МСК снижается, свидетельствуя об угнетении их функциональной активности под влиянием малых и средних доз ИИ.

4. Показано, что эффекты, оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК в ранние сроки культивирования после облучения (48 часов) в малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр, отличаются от эффектов оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК на ранних сроках культивирования (48 часов) после облучения средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр. Факторы кондиционированных сред, полученных от МСК в отдаленные сроки культивирования после облучения как малыми, так и средними дозами, не оказывают влияния на пролиферативную активность необлученных клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fazel R, Krumholz H, Wang Y. Exposure to Low-Dose Ionizing Radiation from Medical Imaging Procedures // J Vasc Surg. 50 (6): 1526-1527. (2009). 10.1016/j.jvs.2009.10.095

2. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection // ICRP publication 103. 37 (2-4): 1-332. (2007). 10.1016/j.icrp.2007.10.003\

3. Squillaro T, Galano G, De Rosa R, Peluso G, Galderisi U. Concise Review: The Effect of Low-Dose Ionizing Radiation on Stem Cell Biology: A Contribution to Radiation Risk // StemCells. 36 (8): 1146-1153. (2018). 10.1002/stem.2836

4. Osipov AN, Pustovalova M, Grekhova A, et al. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of γH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells // Oncotarget. 6 (29): 27275-27287. (2015) 10.18632/oncotarget.4739

5. Ji K, Wang Y, Du L, et al. Research Progress on the Biological Effects of Low-Dose Radiation in China // Dose Response. 17 (1): 1559325819833488. (2019). 10.1177/1559325819833488

6. Doss M. Are We Approaching the End of the Linear No-Threshold Era? // J Nucl Med. 59(12): 1786-1793. (2018). 10.2967/jnumed.118.217182

7. Thurairajah K, Broadhead M, Balogh Z. Trauma and Stem Cells: Biology and Potential Therapeutic Implications // Int J Mol Sci. 18 (3): 577. (2017). 10.3390/ijms18030577

8. Ullah I, Subbarao R, Rho G. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective // Biosci Rep. 35(2). (2015). 10.1042/bsr20150025

9. Aggarwal R, Lu J, J. Pompili V, Das H. Hematopoietic Stem Cells: Transcriptional Regulation, Ex Vivo Expansion and Clinical Application // Curr Mol Med. 12 (1): 34-49. (2012). 10.2174/156652412798376125

10. Wang Q, Sun B, Wang D et al. Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cause Mature Dendritic Cells to Promote T-Cell Tolerance // Scand J Immunol. 68 (6): 607-615. (2008). 10.1111/j.1365-3083.2008.02180

11. Spaggiari G, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari M, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2 // Blood. 111 (3): 1327-1333. (2008). 10.1182/blood-2007-02-074997

12. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin // Tissue Antigens. 69 (1): 1-9. (2007). 10.1111/j.1399-0039.2006.00739.

13. Chen L, Tredget E, Wu P, Wu Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing // PLoS One. 3(4):e1886. (2008). 10.1371/journal.pone.0001886

14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular

Therapy position statement // Cytotherapy. 8 (4): 315-317. (2006). 10.1080/14653240600855905

15. Gronthos S, Franklin D, Leddy H, Robey P, Storms R, Gimble J. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells // J Cell Physiol. 189 (1): 54-63. (2001). 10.1002/jcp.1138

16. Friedenstein A, Chailakhjan R, Lalykina K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Prolif. 3 (4): 393-403. (1970). 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347

17. Bonab M, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari S, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro // BMC Cell Biol. 7 (1): 14. (2006). 10.1186/1471-2121-7-14

18. Chen G, Yue A, Ruan Z, YinY, Wang R, Ren Y, Zhu L. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium // Cell Tissue Bank. 15 (1): 513–521. (2014). 10.1007/s10561-014-9420-6.

19. Netsch P, Elvers-Hornung S, Uhlig S, etal. Human mesenchymal stromal cells inhibit platelet activation and aggregation involving CD73-converted adenosine // StemCellResTher. 9 (1): 184. (2018). 10.1186/s13287-018-0936-8.

20. CanepaDD, CasanovaEA, ArvanitiE, etal. Identification of ALP+/CD73+ defining markers for enhanced osteogenic potential in human adipose-derived mesenchymal stromal cells by mass cytometry // StemCellResTher. 12 (1): 7. (2021). 10.1186/s13287-020-02044-4

21. Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, et al. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells // Stem Cell Res Ther. 7 (1): 97. (2016). 10.1186/s13287-016-0359-3

22. Barker TH, Grenett HE, MacEwen MW, Tilden SG, Fuller GM, Settleman J, et al. Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and RhoGTPase activity // Exp Cell Res. 295: 488–96. (2004). 10.1016/j.yexcr.2004.01.026

23. Barker TH, Hagood JS. Getting a grip on Thy-1 signaling // Biochim Biophys Acta. 1793: 921–3. (2009). 10.1016/j.bbamcr.2008.10.004

24. Woeller CF, O'Loughlin CW, Pollock SJ, Thatcher TH, Feldon SE, Phipps RP. Thy1 (CD90) controls adipogenesis by regulating activity of the Src family kinase // Fyn FASEB. 29: 920–31. (2015). 10.1096/fj.14-257121

25. Sibov TT, Severino P, Marti LC, Pavon LF, Oliveira DM, Tobo PR, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation // Cytotechnology. 64: 511–21. (2012). 10.1007/s10616-012-9428-3

26. James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation // Scientifica. 2013: 684736. (2013). 10.1155/2013/684736

27. Saalbach A, Anderegg U. Thy-1: more than a marker for mesenchymal stromal cells // FASEB J. 33 (6): 6689-6696. (2019). 10.1096/fj.201802224R

28. Phipps RP, Penney DP, Keng P, et al. Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC // Am J Respir Cell Mol Biol. 1 (1): 65-74. (1989). 10.1165/ajrcmb/1.1.65

29. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases // Angiogenesis. 11 (1): 79-89. (2008). 10.1007/s10456-008-9101-9

30. Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology // J Cell Biochem. 102 (6): 1375-1388. (2007). 10.1002/jcb.21594

31. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential // Stem Cell Rev Rep. 7 (1): 64-76. (2011). 10.1007/s12015-010-9147-0

32. Jiang T, Liu W, Lv X, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells // Biomaterials. 31 (13): 3564-3571. (2010). 10.1016/j.biomaterials.2010.01.050

33. Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities // PLoS One. 8 (10): e76979. (2013). 10.1371/journal.pone.0076979

34. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix // Stem Cells. 24: 928–35. (2006). 10. 1634/stemcells.2005-0186.

35. Sapaeth EL, Labaff AM, Toole BP, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment // Cancer Res. 73 (17). (2013). 10.1158/0008-5472

36. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44 // J Biol Chem. 35: 26967–75. (2000).

37. Sackstein R. The biology of CD44 and HCELL in hematopoiesis: the 'step 2-bypass pathway' and other emerging perspectives // Curr Opin Hematol. 18 (4): 239—248. (2011). 10.1097/MOH.0b013e3283476140

38. Pham PV, Phan NL, Nguyen NT, Truong NH, Duong TT, Le DV, et al. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy // J Transl Med. 9: 209. (2011). 10.1186/1479-5876-9-209.].

39. Donnenberg VS, Donnenberg AD, Zimmerlin L, Landreneau RJ, Bhargava R, Wetzel RA, et al. Localization of CD44 and CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors // Cytometry B Clin Cytom. 78B: 287–301. (2010). 10.1002/cyto.b.20530

40. Li W, Xu H, Qian C. c-Kit-Positive Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Growth and Angiogenesis of Breast Cancer // Biomed Res Int. 2017: 7407168. (2017). 10.1155/2017/7407168

41. Blazquez-Martinez A., Chiesa M., Arnalich F., Fernandez- Delgado J., Nistal M., De Miguel M. P. C-Kit identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in adipose tissue with higher telomerase expression and differentiation potential // Differentiation. 87 (3-4): 147–160. (2014). 10.1016/j.diff.2014.02.007

42. Resca E., Zavatti M., Maraldi T. et al. Enrichment in c-Kit improved differentiation potential of amniotic membrane progenitor/stem cells // Placenta. 36 (1): 18–26. (2015). 10.1016/j.placenta.2014.11.002

43. Kuonen F., Laurent J., Secondini C. et al. Inhibition of the kit ligand/c-kit axis attenuates metastasis in a mouse model mimicking local breast cancer relapse after radiotherapy // Clinical Cancer Research. 18 (16): 4365–4374. (2012). 10.1158/1078-0432.CCR-11-3028

44. Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array // Int J Stem Cells. 2: 59-68. (2009). 10.15283/ijsc.2009.2.1.59

45. Elman JS, Li M, Wang F, Gimble JM, Parekkadan B. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation // J Inflamm (Lond). 11:1. (2014). 10.1186/1476-9255-11-1

46. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning // Front Immunol. 9: 28-37. (2018). 10.3389/fimmu.2018.02837

47. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation // Cell Stem Cell 13: 392-402. (2013). 10.1016/j.stem.2013.09.006

48. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines post irradiation leads to pulmonary fibrosis // Int J Radiat Oncol Biol Phys. 33: 99–109. (1995). 10.1016/0360-3016(95)00095-G

49. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications // Int Immunol. 22: 347-352. (2010). 10.1093/intimm/dxq030

50. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses // J Clin Invest. 101: 311-320. (1998). 10.1172/JCI1368

51. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines // Annu Rev Immunol. 15: 797-819. (1997). 10.1146/annurev.immunol.15.1.797

52. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease // Cold Spring Harb Perspect Biol. 6 (10): a016295. (2014). 10.1101/cshperspect.a016295

53. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 // Biochim Biophys Acta. 1813: 878-888. (2011). 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034

54. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130 // Blood. 86 (4): 1243-1254. (1995).

55. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans // Am J Physiol Endocrinol Metab. 285: 433-437. (2003). 10.1152/ajpendo.00074.2003

56. Perrini S, Ficarella R, Picardi E, Cignarelli A, Barbaro M,Nigro P, Peschechera A, Palumbo O, Carella M, De Fazio M, Natalicchio A, Laviola L, Pesole G, Giorgino F. Differences in gene expression and cytokine release profiles highlight the heterogeneity of distinct subsets of adipose tissue derived stem cells in the subcutaneous and visceral adipose tissue in humans // PLoS One. 8: e57892. (2013). 10.1371/journal.pone.0057892

57. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells // Trends Mol Med. 18: 128-134. (2012). 10.1016/j.molmed.2011.10.004

58. Cui X, Liu J, Bai L, Tian J, Zhu J. Interleukin-6 induces ma- lignant transformation of rat mesenchymal stem cells in as- sociation with enhanced signaling of signal transducer and activator of transcription // Cancer Sci. 105: 64-71. (2014). 10.1111/cas.12313

59. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R,Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Immunol Lett. 126: 37-42 (2009). 10.1016/j.imlet.2009.07.010

60. Müller K, Meineke V. Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells // Exp Hematol. 35 (4): 96-104. (2007). 10.1016/j.exphem.2007.01.017

61. Tabata C, Kubo H, Tabata R, et al. All-trans retinoic acid modulates radiation-induced proliferation of lung fibroblasts via IL-6/IL-6R system // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 290: 597–L606. (2006). 10.1152/ajplung.00282.2005

62. Brach MA, Gruss HJ, Kaisho T, Asano Y, Hirano T, Herrmann F. Ionizing radiation induces expression of interleukin 6 by human fibro- blasts involving activation of nuclear factor-kappa B // J Biol Chem. 268: 8466–8472. (1993).

63. Margulies L, Sehgal PB. Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP b (NF-IL6) activity by p53 species // J Biol Chem. 268: 15096–15100. (1993).

64. Beetz A, Messer G, Oppel T, van Beuningen D, Peter RU, Kind P. In- duction of interleukin 6 by ionizing radiation in a human epithelial cell line: control by corticosteroids // Int J Radiat Biol. 72: 33–43. (1997).

65. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint // J Leu- koc Biol. 78: 1043-1051. (2005). 10.1189/ jlb.0705358

66. Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti- inflammatory cytokines: important immunoregulatory fac- tors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis // Chemother ResPract. 2012: 490804. (2012). 10.1155/2012/490804

67. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, Jack RS, Wunderlich FT, Brüning JC, Müller W, Rudensky AY. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation // Immunity. 34: 566-578. (2011). 10.1016/j.immuni.2011.03.018

68. DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases // Curr Opin Biotechnol. 23: 978-983. (2012). 10.1016/j.copbio.2012.05.005

69. Marti LC, Pavon L, Severino P, Sibov T, Guilhen D, Moreira- Filho CA. Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation // Mem Inst Oswaldo Cruz. 109: 70-79. (2014).10.1590/0074-0276130252

70. Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, Nadaf S, Carbone DP. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation // J Immunol 174: 215-222. (2005). 10.4049/jimmunol.174.1.215

71. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, Nixon AB, Lyerly HK, Clay T, Morse MA. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients // Cancer Immunol Immunother. 57: 1115-1124. (2008). 10.1007/s00262-007-0441

72. Wada J, Suzuki H, Fuchino R, Yamasaki A, Nagai S, Yanai K, Koga K, Nakamura M, Tanaka M, Morisaki T, Katano M. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions // Anticancer Res. 29: 881-888. (2009).

73. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury // Am J Physiol Renal Physiol. 292: 1626-1635. (2007). 10.1152/ajprenal.00339.2006

74. Wang M, Zhang W, Crisostomo P, Markel T, Meldrum KK, Fu XY, Meldrum DR. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production // J Mol Cell Cardiol. 42: 1009-1015. (2007). 10.1016/ j.yjmcc.2007.04.010

75. SuJ, ChenX, HuangY, LiW, LiJ et al. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species // Cell Death Differ. 21: 388-396. (2014). 10.1038/cdd.2013.149

76. Jacobs SA, Pinxteren J, Roobrouck VD, Luyckx A, van't Hof W, Deans R, Verfaillie CM, Waer M, Billiau AD, Van Gool SW. Human multipotent adult progenitor cells are nonim- munogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T-cell responses // Cell Transplant. 22: 1915-1928. (2013). 10.3727/096368912X657369

77. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, Rico L, Camarillo E, García L, Abad JL, Trigueros C, Delgado M, Büscher D. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase ex- pression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-

derived stem cells // Tissue Eng Part. 15: 2795-2806. (2009). 10.1089/ten. TEA.2008.0630

78. Luo C, Jia W, Wang K. et al. Human amniotic fluid stem cells suppress PBMC proliferation through IDO and IL-10-dependent pathways // Curr Stem Cell Res Ther. 9: 36-45. (2014). 10.2174/1574888X113086660067

79. Maby-El Hajjami H, Amé-Thomas P, Pangault C, Tribut O. et al. Functional alteration of the lym- phoma stromal cell niche by the cytokine context: role of indoleamine-2,3 dioxygenase // Cancer Res. 69: 3228-3237. (2009). 10.1158/0008-5472.CAN-08-3000

80. Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells matu- ration by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway // PLoS One. 8: e55487. (2013). 10.1371/journal.pone.0055487

81. Ankrum JA, Dastidar RG, Ong JF, Levy O, Karp JM. Performance-enhanced mesenchymal stem cells via intracellular delivery of steroids // Sci Rep. 4: 4645. (2014). 10.1038/srep04645

82. Lotfi R, Eisenbacher J, Solgi G, Fuchs K, Yildiz T, Nienhaus C, Rojewski MT, Schrezenmeier H. Human mesenchymal stem cells respond to native but not oxidized damage associated molecular pattern molecules from necrotic (tumor) material // Eur J Immunol. 41: 2021-2028. (2011). 10.1002/eji.201041324

83. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10 // Exp Mol Med. 41: 315-324. (2009). 10.3858/emm.2009.41.5.035

84. Lin W, Oh SK, Choo AB, George AJ. Activated T cells modulate immunosuppression by embryonic-and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells through a feedback mechanism // Cytotherapy. 14: 274-284. (2012). 10.3109/14653249.2011.635853

85. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells // World J Stem Cells. 6(5): 552-570. (2014). 10.4252/wjsc.v6.i5.552

86. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines // J Allergy Clin Immunol. 111: 460-475. (2003). 10.1067/mai.2003.108

87. Ohashi K, Naruto M, Nakaki T, Sano E. Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L // Biochim Biophys Acta. 1649: 30–39. (2003). 10.1016/s1570-9639(03)00152-3

88. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 283: 7-28. (2002). 10.1152/ajpregu.00738.2001

89. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells // Cytokine Growth Factor Rev. 20: 419-427. (2009). 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002

90. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted

action of chemokines and nitric oxide // Cell Stem Cell. 2: 141-150. (2008). 10.1016/j.stem.2007.11.014

91. Beetz A, Peter RU, Ried C, Ruzicka T, Michel G. Uniform induction of TNF-a and IL-8 in human keratinocytes by ionizing radiation is accompanied by non-uniform regulation of corresponding receptors // J Eur Acad Dermatol Venereol. 7:188–190. (1996).

92. Narayanan PK, LaRue KE, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells // Radiat Res. 152: 57–63. (1999).

93. Fujimori A, Okayasu R, Ishihara H, et al. Extremely low dose ionizing radiation up-regulates CXC chemokines in normal human fibroblasts // Cancer Res. 65: 10159–10163. (2005). 10.1158/0008-5472.CAN-05-2015

94. Martin M, Vozenin MC, Gault N, Crechet F, Pfarr CM, Lefaix JL. Co-activation of AP-1 activity and TGF-b1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation // Oncogene. 15: 981–989. (1997).

95. LomaxME, Folkes LK, O'Neill P. Biological consequences of radiation- induced DNA damage: relevance to radiotherapy // Clin. Oncol. 25 (1): 578–585. (2013). 10.1016/j.clon.2013.06.007

96. Mao Z, BozzellaM, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of non-homologous end joining and homologous recombination in human cells // DNA Repair. 7 (1): 1765–1771. (2008). 10.1016/j.dnarep.2008.06.018

97. Solokov M., Neumman R. Human embryonic stem cell responses to ionizing radiation exposures: current state of knowledge and future challenges // Stem Cells Int. 2012: 579104. (2012). 10.1155/2012/579104

98. Prise KM, Saran A. Concise review: stem cell effects in radiation risk // Stem Cells. 29 (1): 1315–1321. (2011). 10.1002/stem.690

99. Delacote F, Lopez BS. Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model // Cell Cycle. 7(1): 33–38. (2008). 10.4161/cc.7.1.5149

100. Islam MS, Stemig ME., Takahashi Y, Hui SK. Radiation response of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human pluripotent stem cells // J. Radiat. Res. 56 (1): 269–277. (2015). 10.1093/jrr/rru098

101. Пустовалова М.В., Грехова А.К., Осипов А.Н. Мезенхимальные стволовые клетки: эффекты воздействия ионизирующего излучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 58 (4): 352–362. (2018). 10.1134/S086980311804015X

102. Nicolay Net al. Mesenchymal stem cells are resistant to carbon ion radiotherapy // Oncotarget. 6 (1): 2076–2087. (2015). 10.18632/oncotarget.2857

103. Oliver L et al. Differentiation-related response to DNA breaks in human mesenchymal stem cells // Stem Cells. 31(1): 800–807. (2013). 10.1002/stem.1336

104. TsvetkovaA et al. γH2AX, 53BP1 and Rad51 protein foci changes in mesenchymal stem cells during prolonged X-ray irradiation // Oncotarget. 8 (1): 64317–64329. (2017). 10.18632/oncotarget.19203

105. Wu P et al. Early passage mesenchymal stem cells display decreased radiosensitivity and increased DNA repair activity // Stem Cells Transl Med. 6 (1): 1504–1514. (2017). 10.1002/sctm.15-0394

106. Aypar U, Morgan W, Baulch J. Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link? // Int. J. Radiat. Biol. 87 (1): 179–191. (2011). 10.3109/09553002.2010.522686

107. Meyer B et al. Histone H3 lysine 9 acetylation obstructs ATM activation and promotes ionizing radiation sensitivity in normal stem cells // Stem Cell Rep. 7 (1): 1013–1022. (2016). 10.1016/j.stemcr.2016.11.004

108. Armstrong C et al. DNMTs are required for delayed genome instability caused by radiation // Epigenetics. 7 (1): 892–902. (2012). 10.4161/epi.21094

109. Tang F, Loke W. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability // Int J Radiat Biol. 91 (1): 13-27. (2015). 10.3109/09553002.2014.937510

110. Воробьева Н.Ю., Уйба В.В., Кочетков О.А., Астрелина Т.А., Пустовалова М.В., Грехова А.К., Блохина Т.М., Яшкина Е.И., Кабанов Д.И., Никитина В.А., Сучкова Ю.Б., Кобзева И.В., Осипов А.Н. Влияние 3Н-тимидина на индукцию двунитевых разрывов ДНК в мезенхимальных стволовых клетках человека // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 63 (1): 28–34. (2018). 10.12737/article_5a855c9d5b1211.49546901

111. Vorob'eva N.Y., Kochetkov O.A., Pustovalova M.V., Grekhova A.K., Blokhina T.M., Yashkina E.I., Osipov A.A., Kabanov D.I., Surin P.P., Barchukov V.G., Osipov A.N. Comparative Analysis of the Formation of γH2AX Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to (3)H-Thymidine, Tritium Oxide, and X-Rays Irradiation // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 166 (1): 178-181. (2018). 10.1007/s10517-018-4309-1

112. Pustovalova M., Astrelina T.A., Grekhova A., Vorobyeva N., Tsvetkova A., Blokhina T., Ni-kitina V., Suchkova Y., Usupzhanova D., Brunchukov V., Kobzeva I. et al. Residual γH2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells // Aging. 9 (11): 2397-2410. (2017). 10.18632/aging.101327

113. Ulyanenko S., Pustovalova M., Koryakin S., Beketov E., Lychagin A., Ulyanenko L., Kaprin A. et al. Formation of γH2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation // International Journal of Molecular Sciences. 20 (11): E2645. (2019). 10.3390/ijms20112645

114. Liu S. On radiation hormesis expressed in the immune system // Critical Reviews in Toxicology. 33 (1): 431-441. (2003). 10.1080/713611045

115. Liang X, So YH, Cui J, Ma K, Xu X, Zhao Y, Cai L, Li W. The low-dose ionizing radiation stimulates cell proliferation via activation of the

MAPK/ERK pathway in rat cultured mesenchymal stem cells // Journal of Radiation Research. 52 (1): 380-386. (2011). 10.1269/jrr.10121

116. Truong K, Bradley S, Baginski B, Wilson J, Medlin D, Zheng L, Wilson R, Rusin M, Takacs E, Dean D. The effect of well-characterized, very low-dose x-ray radiation on fibroblasts // PLoS One. 13 (1): e0190330. (2018). 10.1371/journal.pone.0190330

117. Bernal A, Dolinoy D, Huang D, Skaar D, Weinhouse C, Jirtle R. Adaptive radiation-induced epigenetic alterations mitigated by antioxidants // Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 27 (1): 665-671. (2013). 10.1096/fj.12-220350.

118. Grdina D, Murley J, Miller R, Mauceri H, Sutton H, Thirman M, Li J, Woloschak G, Weichselbaum R. A Manganese Superoxide Dismutase (SOD2)-Mediated Adaptive Response // Radiation Research. 179 (1): 115-124. (2013). 10.1667/RR3126.2

119. Marchese M, Hall E. Encapsulated iodine-125 in radiation oncology. II. Study of the dose rate effect on potentially lethal damage repair (PLDR) using mammalian cell cultures in plateau phase // American Journal of Clinical Oncology. 7 (1): 613-616. (1984).

120. Boreham D, Mitchel R. DNA lesions that signal the induction of radioresistance and DNA repair in yeast // Radiation Research. 128 (1): 19-28. (1991).

121. Morgan W, Day J, Kaplan M, McGhee E, Limoli C. Genomic instability induced by ionizing radiation // Radiation Research. 146 (1): 247-258. (1996).

122. Pampfer S, Streffer C. Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote X-irradiation // Radiation Biology. 55 (1): 85–92. (1989). 10.1080/09553008914550091

123. Smith L, Nagar S, Kim G, Morgan W. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response // Health Physics. 85 (1): 23-29. (2003). 10.1097/00004032-200307000-00006.

124. McIlrath J, Lorimore S, Coates P, Wright E. Radiation induced genomic instability in immortalized haemopoietic stem cells // International Journal of Radiation Biology. 79 (1): 27–34. (2003).

125. El-Osta, A. The rise and fall of genomic methylation in cancer // Leukemia. 18 (1): 233–237. (2004). 10.1038/sj.leu.2403218

126. Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T. Vanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses // Journal of Radiation Research. 48 (1): 97–106. (2007). 10.1269/jrr.06090

127. Elbakrawy EM, Hill MA, Kadhim MA. Radiation-induced Chromosome Instability: The Role of Dose and Dose Rate // Genome Integr. 10: 3. (2019). 10.4103/genint.genint_5_19

128. Klokov D, Criswell T, Leskov K, Araki S, Mayo L, Boothman D. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing

radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects // Mutation Research. 568 (1): 97-110. (2004). 10.1016/j.mrfmmm.2004.06.049

129. Moore S, Marsden S, Macdonald D, Mitchell S, Folkard M, Michael B, Goodhead D, Prise K, Kadhim M. Genomic instability in human lymphocytes irradiated with individual charged particles: involvement of tumor necrosis factor alpha in irradiated cells but not bystander cells // Radiation Research. 163 (1): 183-190. (2005). 10.1667/rr3298.

130. PiccininiA, Midwood K. DAMPening inflammation by modulating TLR signaling // Mediator inflamm. 2010: 672395. (2010). 10.1155/2010/672395

131. Ilnytskyy Y, KoturbashI, Kovalchuk O. Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue-specific manner // Environ. Mol. Mutagen. 50 (2): 105-113. (2009). 10.1002/em.20440

132. Yahyapour R, Amini P, Rezapoor S, Rezaeyan A, Farhood B, Cheki M, Fallah H, Najafi M. Targeting of Inflammation for Radiation Protection and Mitigation // Curr. Mol. Pharmacol. 11 (3): 203-210. (2018). 10.2174/1874467210666171108165641

133. Zhang J, Liu J, Ren J, Sun T, Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF-B expression in lung tissue // Int J Mol Med. 33 (4): 817-824. (2014). 10.3892/ijmm.2014.1650

134. Yahyapour R, Motevaseli E, Rezaeyan A, Abdollahi H, Farhood B, Cheki M, Najafi M, Villa V. Mechanisms of Radiation Bystander and Non-Targeted Effects: Implications to Radiation Carcinogenesis and Radiotherapy // CurrRadiopharm. 11 (1): 34-45. (2018). 10.2174/1874471011666171229123130

135. Kumar JellaK, RaniS, O'Driscoll L, McClean B, Byrne H, LyngF. Exosomes are involved in mediating radiation induced bystander signaling in human keratinocyte cells // Radiat. Res. 181 (2): 138-145. (2014). 10.1667/RR13337.1

136. XuS, Wang, J, Ding N, Hu W, Zhang X, Wang B, Hua J, Wei W, Zhu Q. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect // RNA. Biol. 12 (12): 1355-1363. (2015). 10.1080/15476286.2015.1100795

137. Ma Y, Zhang L, Rong S, Qu H, Zhang Y, Chang D, Pan H, Wang W. Relation between gastric cancer and protein oxidation, DNA damage, and lipid peroxidation // Oxid. Med. Cell Lon-gev. 2013: 543760. (2013). 10.1155/2013/543760

138. ChaudhryM. Real-time PCR analysis of micro-RNA expression in ionizing radiation-treated cells // Cancer Biother. Radiopharm. 24 (1): 49-56. (2009). 10.1089/cbr.2008.0513

139. Findik D, Song Q, Hidaka H, Lavin M. Protein kinase A inhibitors enhance radiationinduced apoptosis. // J. Cellular Bio-chem. 57 (1): 12-21. (1995). 10.1002/jcb.240570103

140. Dong C, He M, Ren R, Xie Y, Yuan D, Dang B, Li W, Shao C. Role of the MAPK pathway in the observed bystander effect in lymphocytes co-cultured with macrophages irradiated with gamma-rays or carbon ions // Life Sci. 127 (1): 19-25. (2015). 10.1016/j.lfs.2015.02.017

141. Moon K, Stukenborg G, Keim J, Theodorescu D. Cancer incidence after localized therapy for prostate cancer // Cancer. 107 (5): 991-998. (2006). 10.1002/cncr.22083

142. Marozik P, Mothersill C, Seymour C.B, Mosse I, Melnov S. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident // Exp. Hematol. 35 (4): 55-63. (2007). 10.1016/j.exphem.2007.01.029

143. Halimi M, Parsian H, Asghari S, Sariri R, MoslemiD, Yeganeh F, Zabihi E. Clinical translation of human microRNA-21 as a potential biomarker for exposure to ionizing radiation // Transl. Res. 163 (6): 578-584. (2014). 10.1016/j.trsl.2014.01.009

144. Никитина В.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Нугис В.Ю., Ломоносова Е.Е., Семина В. В., Брунчуков В. А., Усупжанова Д. Ю. и др. Цитогенетическая характеристика диплоидных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток // Цитология. 63(3): 207–220. (2021).

145. Schröder S, Kriesen S, Paape D, Hildebrandt G, Manda K. Modulation of Inflammatory Reactions by Low-Dose Ionizing Radiation: Cytokine Release of Murine Endothelial Cells Is Dependent on Culture Conditions // J Immunol Res. 2018: 2856518. (2018). 10.1155/2018/2856518

146. Chen SL, Cai L, Meng QY, Xu S, Wan H, Liu SZ. Low-dose whole-body irradiation (LD-WBI) changes protein expression of mouse thymocytes: effect of a LD-WBI-enhanced protein RIP10 on cell proliferation and spontaneous or radiation-induced thymocyte apoptosis // Toxicol Sci. 55 (1): 97-106. (2000). 10.1093/toxsci/55.1.97

147. Belmans N, Gilles L, Welkenhuysen J, et al. In vitro Assessment of the DNA Damage Response in Dental Mesenchymal Stromal Cells Following Low Dose X-ray Exposure // Front Public Health. 9: 584484. (2021). 10.3389/fpubh.2021.584484

148. Fabbri E, Brognara E, Montagner G, et al. Regulation of IL-8 gene expression in gliomas by microRNA miR-93 //BMC Cancer. 15: 661. (2015). 10.1186/s12885-015-1659-1

149. Mothersill C, Rea D, Wright EG, et al. Individual variation in the production of a `bystander signal' following irradiation of primary cultures of normal human urothelium // Carcinogenesis. 22 (9): 1465-71. (2001). 10.1093/carcin/22.9.1465

150. Mothersill C, Seymour CB. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium // Radiat. Res. 149: 256-62. (1998).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает особую благодарность руководителю диссертационной работы доктору биологических наук Астрелиной Т.А. за идею, лежащую в основе представленной работы, ценные советы и всестороннюю помощь, а также сотрудникам Центра Биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, в особенности, Кобзевой И.В., Сучковой Ю.Б., Никитиной В.А., Брунчукову В.А., Соколовой Н.В. и Добровольской Е.И. за помощь в реализации экспериментов, а также замечания и полезные предложения в ходе работы над текстом диссертации и всестороннюю поддержку на протяжении всего исследовательского процесса.