

УСУПЖАНОВА ДАРЬЯ ЮРЬЕВНА

**Оценка влияния малых и средних доз ионизирующего излучения на
мезенхимальные стромальные клетки человека**

Специальность
1.5.1 – «Радиобиология»

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

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

Научный руководитель

Астрелина Татьяна Алексеевна доктор медицинских наук, доцент, руководитель центра биомедицинских и аддитивных технологий ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России

Официальные оппоненты

Глушкова Ольга Валентиновна доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Рыбкина Валентина Львовна

доктор медицинских наук, заведующая лабораторией радиационной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Южно-уральский институт биофизики» Федерального медико-биологического агентства России

Ведущая организация

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России

Защита диссертации состоится «23» июня 2022 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 68.1.003.01 (Д 462.001.04) при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» по адресу: 123182, г. Москва, ул. Живописная, 46. Тел.: +7 (495) 190-96-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» и на сайте организации.

Автореферат разослан « » 2022 года

Учёный секретарь
диссертационного совета, доктор медицинских наук

Шандала Н.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На протяжении жизни человек неизбежно подвергается воздействию малых доз (от 10 до 100 мГр) (Fazel R., 2009) ионизирующего излучения (ИИ), как фонового, так и в рамках медицинской диагностики и лечения, от свалок радиоактивных отходов, в ходе профессиональной деятельности, а также авиаперелетов (ICRP, 2007). Международный комитет по радиационной защите (МКРЗ) обозначил критические значения малых доз ИИ для человека в диапазоне от 20 до 50 мГр в год (Fazel R., 2009). 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 (Squillaro T., 2018), 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 (ICRP, 2007), 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 двуниевых разрывов ДНК (Osipov AN., 2015), и, поскольку каждый двуниевый 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 (ICRP, 2007). 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 (Ji K., 2019). 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 (Doss M., 2018). 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.

Цель и задачи

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 исследования

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, развивающихся 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 работы

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 использовании современных точных методов исследований, комплексно отражающих наблюдаемые изменения и закономерности. На протяжении всего исследования культивирование клеточной линии осуществлялось непрерывно (64 дня). 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.

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, обоснованных условиями проводимого эксперимента.

Апробация диссертации проведена на заседании секции №2 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Материалы диссертации доложены на школе-конференции молодых ученых «Ильинские чтения-2018» и «Ильинские чтения 2019», конкурсе секции «Молодые профессиональные» в рамках 5-ого Европейского конгресса Международной ассоциации радиационной защиты (Гаага, Нидерланды), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2019», II Межрегиональной молодежной научной конференции «Достижения и перспективы молодых ученых», 64ой ежегодной встрече Общества физики здоровья (США, Орlando), 3-й Российской научной конференции с международным участием «Радиобиологические основы лучевой терапии», IV Национальном конгрессе по

регенеративной медицине, III Научно-практической конференции с международных участием «Научный авангард», посвященной 75-летию ФМБЦ им. А.И. Бурназяна.

Публикации

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

Структура диссертации

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, списка литературы, включающего 150 литературных источников: 3 – отечественных и 147 – иностранный автор, и благодарностей.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Дизайн исследования

На всем протяжении исследования, продолжавшегося 64 дня, клеточная линия МСК слизистой ткани десны человека культивировалась непрерывно. Перед началом эксперимента были определены временные точки для оценки изменений, происходящих в клеточной линии до и после облучения, и, таким образом, сформирован дизайн исследования (Рисунок 1).

Выделение культуры МСК из образца слизистой ткани десны человека

Культура МСК была выделена из неперсонифицированного образца биоптата слизистой ткани десны человека объемом 8 мм³. Полученный биоптат инкубировали в среде DMEM F12, содержащей 2% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 200 Ед/мл пенициллина, 200 мг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл амфотерицина и 100 Ед/мл гентамицина (StemCell Technology, США), при 4°C не менее 8 часов. Далее образец диспергировали и инкубировали в 0,25% растворе трипсин-EDTA (Gibco, США) при 37°C 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°C в течение 2 часов, после чего реакцию останавливали внесением равного объема FBS и отмывали образец 1xPBS (300g, 7 минут). Полученную суспензию высевали в 25 см² культуральный флакон (TPP, Швеция) в составе культуральной среды MesenCult™ MSC Basal Medium Human с добавлением коммерческого соплемент (STEMCELL Technologies, Канада), антибиотиков пенициллина – стрептомицина (50 Ед/мл, ПанЭко, Россия) и L – глутамин (2мМ, ПанЭко, Россия). Культивирование первичной культуры МСК осуществлялось в течение 14 дней в условиях 5% CO₂ – инкубатора при температуре 37°C и постоянной влажности.

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 (Dominici M., 2006) в ЦБМиАТ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Культивирование осуществлялось до 12 пассажа включительно. На 5 и 6 пассажах используемая в представленном исследовании культура клеток МСК была проанализирована на предмет цитогенетических изменений

методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (mFISH). Всего было проанализировано 155 клеток: 152 клетки с нормальным кариотипом и 3 клетки с хромосомными абберациями. В целом, доля хромосомных аббераций в культуре составила не более 2%, что не превышает спонтанного уровня хромосомных аббераций у человека. Таким образом, исследуемая клеточная линия может считаться генетически стабильной с низким уровнем хромосомных аббераций (Никитина В.А., 2021).

Ведение клеточной линии осуществлялось с использованием полной 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) в условиях 5% CO₂ – инкубатора при температуре 37°C и постоянной влажности.

Пассирование клеточной линии проводили при достижении ей 90% конfluenceности 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°C, после чего 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 высевали на новый культуральный флакон (или планшет), анализировали или криоконсервировали.

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.

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.

Условия облучения

Клетки облучали на 4 пассаже в логарифмической фазе роста при достижении ими 70% конfluenceности на поверхности культурального флакона. Облучение в дозах 50, 100, 250, 1000 мГр осуществляли в дублях на рентгеновской установке РУСТ-М1 (Россия) с заданными характеристиками (мощность дозы 39 мГр/мин, напряжение 100 кВ, ток пучка 0,8 мА, алюминиевый фильтр 1,5 мм) при температуре 4°C. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях 5% CO₂ – инкубатора при 37°C и постоянной влажности. Погрешность испускаемой дозы не превышала 15%. Согласно рекомендациям МКРЗ дозы 50 и 100 мГр относятся к диапазону малых доз ИИ, дозы 250 и 1000 мГр – к диапазону средних доз ИИ (ICRP, 2007).



Рисунок 1. Схема эксперимента

Иммунофенотипирование клеток

Оценку уровня поверхностных антигенов МСК осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACS CantoII (Becton Dickinson, США). Клетки окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами и красителями (BD Bioscience, США) согласно представленной панели (Таблица 1). В каждой исследуемой пробирке окрашивалось не менее 10^5 клеток.

Таблица 1. Панель флуоресцентно-меченных антител и красителей для 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	-

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.

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ растворимых факторов кондиционированных сред, полученных через 48 часов, 9, 23, 43, 64 дня после облучения, осуществлялся с использованием коммерческих наборов: Human IL-8/CXCL8 Quantikine Elisa Kit (R&D systems, cat. D8000C), Human IL-6 Elisa Kit (Invitrogen, cat. BMS213-2), Human IL10 Elisa kit (Invitrogen, cat. BMS215-2), Human VEGF-A Elisa kit (Invitrogen, cat. BMS277-2), Human IDO Elisa kit (Invitrogen, cat. EH246RB) на планшетном ридере iMark Bio-Rad с помощью программного обеспечения Zmfira. Результаты исследования представлены с учетом количества клеток в культуральном флаконе на момент сбора кондиционированной среды ($\text{пт}/10^6$ клеток).

Оценка пролиферативной активности клеток

Оценку пролиферативной активности клеток осуществляли с использованием клеточного анализатора xCelligence RTCA (ACEA Biosciences, США), инсталлированного в CO_2 - 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.

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.

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), инсталлированного 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 в условиях 5% CO₂ – инкубатора при 37°C и постоянной влажности. Через 48 часов из лунок отбирали 150 мкл культуральной среды и вносили 150 мкл кондиционированной среды, полученной от облученной культуры МСК слизистой ткани десны человека, после чего клетки возвращали в стандартные условия культивирования. Оценку пролиферативной активности МСК проводили с помощью клеточного анализатора xCelligence RTCA.

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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Перед началом исследования проведена оценка уровня экспрессии поверхностных антигенов необлученных клеток. Уровень экспрессии соответствовал требованиям,

предъявляемым к МСК Международным обществом клеточной терапии (Dominici M., 2006).

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

Таблица 2. Экспрессия поверхностных антигенов МСК через 9 дней после облучения.

Параметр	К	50 мГр	100 мГр	250 мГр	1000 мГр
	Количество клеток, %				
CD117	$97,0 \pm 1,50$	$87,1 \pm 2,19^*$	$89,2 \pm 2,88^*$	$93,0 \pm 0,50^*$	$99,0 \pm 1,01$

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

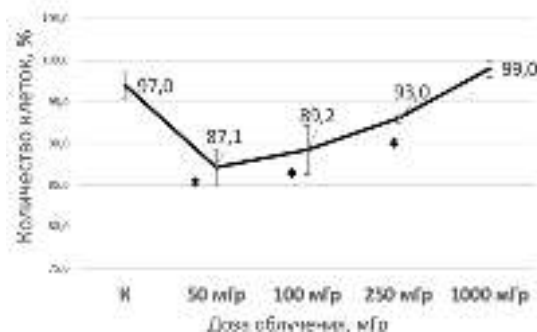


Рисунок 2. Зависимость экспрессии поверхностного антигена МСК CD117 от полученной дозы ИИ через 9 дней после облучения. * ($p < 0,05$) – статистически значимые различия по сравнению с контролем.

Также для группы МСК, облученной в дозе 50 мГр, наблюдалось появление четко обособленной популяции клеток с отрицательной экспрессией CD44 – $1,4 \pm 0,23\%$ ($p < 0,05$) клетки демонстрировали полную потерю данного АГ на своей поверхности (Рисунок 3).

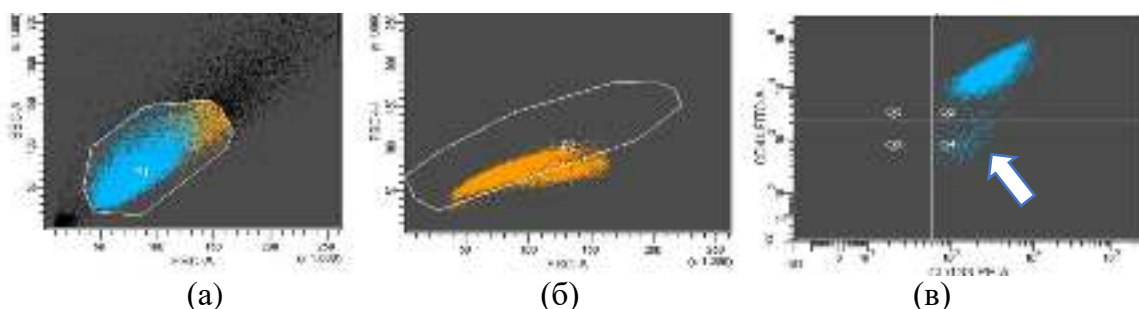


Рисунок 3. Скатерограммы: (а) – выделение гейта МСК по параметрам каналов прямого и бокового светорассеяния; (б) – выделение гейта синглетных МСК по параметрам каналов прямого светорассеяния; (в) – выделение гейта МСК с отрицательной экспрессией поверхностного антигена CD44 через 9 дней после облучения в дозе 50 мГр.

Через 16 дней после облучения наблюдалась практическая полная потеря экспрессии поверхностного антигена CD117 во всех исследуемых группах МСК. При этом наиболее высоким уровень экспрессии данного поверхностного АГ оставался в группе МСК, облученной в дозе 1000 мГр – $1,5 \pm 0,42\%$ ($p < 0,05$). Для остальных облученных групп МСК статистически значимых отличий уровня экспрессии CD117 в сравнении с необлученной

группой контроля не наблюдалось. 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 3).

Таблица 3. 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 4а). 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 4б).

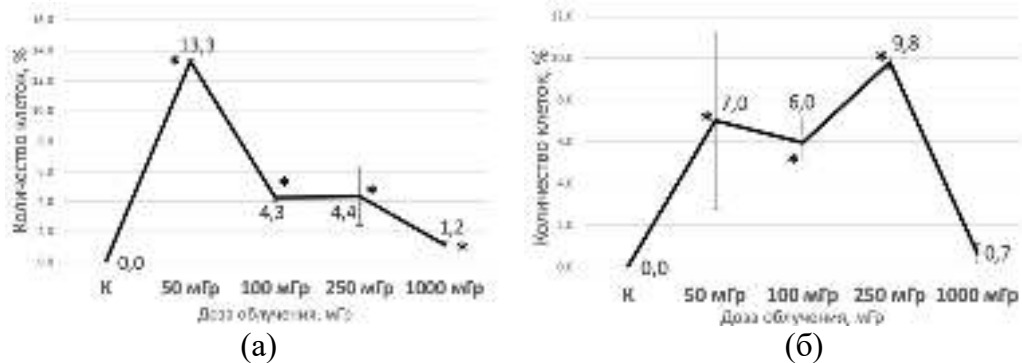


Рисунок 4. Зависимость экспрессии поверхностных антигенов МСК CD90 и CD73 от полученной дозы ИИ через 16 дней после облучения. (а) – снижение плотности экспрессии поверхностного АГ CD90, (б) – снижение плотности экспрессии поверхностного АГ CD73.

* ($p < 0,05$) – 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 5).

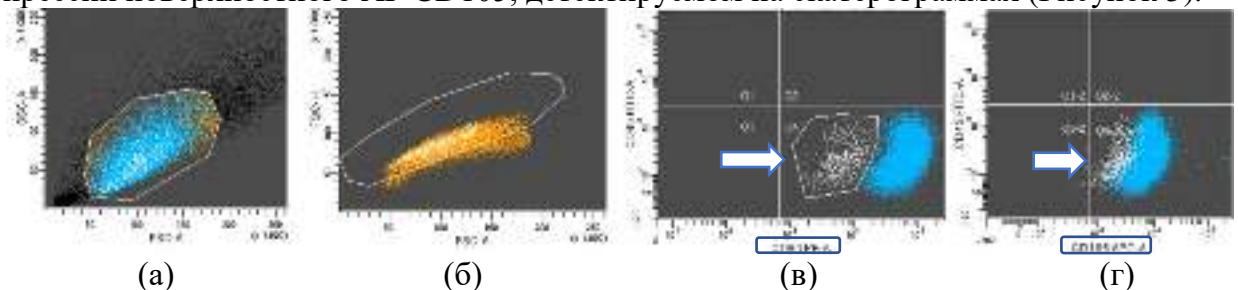


Рисунок 5. Скатерограммы: (а) – выделение гейта МСК по параметрам каналов прямого и бокового светорассеяния; (б) – выделение гейта синглетных МСК по параметрам каналов прямого светорассеяния; (в) – выделение гейта МСК со сниженной плотностью экспрессии поверхностного антигена CD90 через 16 дней после облучения в дозе 50 мГр; (г) – выделение гейта МСК со сниженное плотностью экспрессии поверхностного антигена CD105 через 16 дней после облучения в дозе 50 мГр.

Через 43 дня после облучения изменений экспрессии поверхностных антигенов МСК слизистой ткани десны не наблюдалось.

Через 64 дня после облучения снижение уровня экспрессии поверхностного АГ CD44 в группе клеток, облученной в дозе 50 мГр – $94,5 \pm 0,51\%$ в сравнении с необлученной группой контроля $98,8 \pm 0,57\%$ ($p < 0,05$) (Рисунок 6).

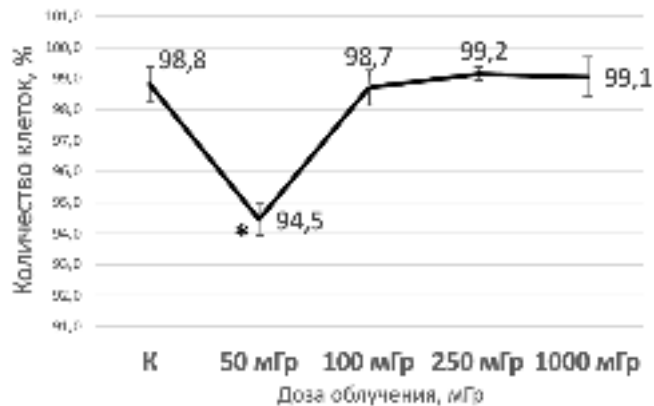


Рисунок 6. Зависимость экспрессии поверхностного антигена МСК CD44 от полученной дозы ИИ через 64 дня после облучения.

* ($p < 0,05$) – 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 (Blazquez-Martinez A., 2014, Resca E., 2015). 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. Наблюдаемая зависимость эффекта от дозы облучения (Рисунок 2) 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 (Tang F., 2015). 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. В то же время группа МСК, получившая дозу облучения 1000 мГр, демонстрировала повышенный уровень экспрессии CD117 в сравнении с уровнем в необлученной группе контроля 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 (Dominici M., 2006), 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 4а). При этом наиболее выраженным снижением плотности экспрессии CD90 характеризовалась группа клеток, получившая малую дозу облучения 50 мГр. Описываемая закономерность также, как и в случае снижения 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.

Таким образом, 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 (Lesley J., 2000), вовлеченного в регуляцию процессов миграции, пролиферации, адгезии, а также дифференцировки и выживаемости клеток (Zhu H., 2006, Saraeth EL., 2013). 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 (Moraes DA., 2016, Barker TH., 2004). 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 происходило 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 (Moraes DA., 2016, Barker TH., 2004).

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 и дополнить изученную панель поверхностных антигенов МСК.

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. 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, 100 мГр и 250 мГр, при этом для группы клеток, облученных в дозе 1000 мГр (Таблица 4), значение концентрации общего белка в кондиционированной среде оставалось на уровне концентрации необлученной группы контроля, наблюдалась зависимость доза-эффект (Рисунок 7а).

Таблица 4. 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*

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

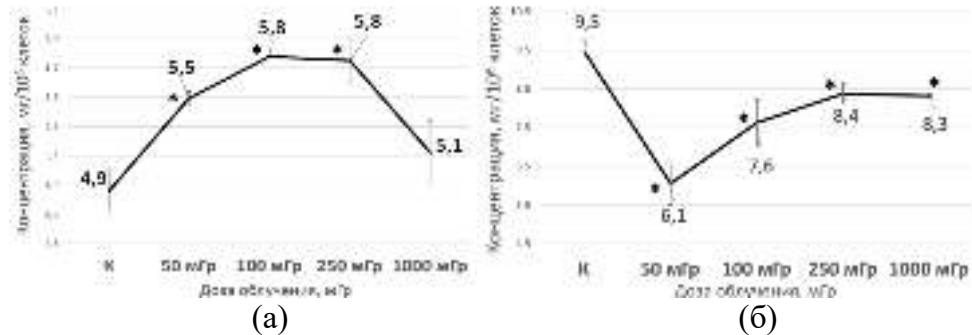


Рисунок 7. Зависимость концентрации общего белка в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ: (а) – через 48 часов после облучения. (б) – через 9 дней после облучения.

* (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 (Рисунок 7б). 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.

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 5.

Таблица 5. 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. В то же время для МСК, облученных в средних дозах 250 и 1000 мГр, концентрация ИЛ-6 в кондиционированной среде снижалась (Рисунок 10а). В целом, была отмечена зависимость доза-эффект.

Через 43 дня после облучения МСК средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр наблюдалось статистически значимое снижение концентрации ИЛ-6 в кондиционированной среде (Рисунок 8а). Наблюдалась зависимость доза-эффект.

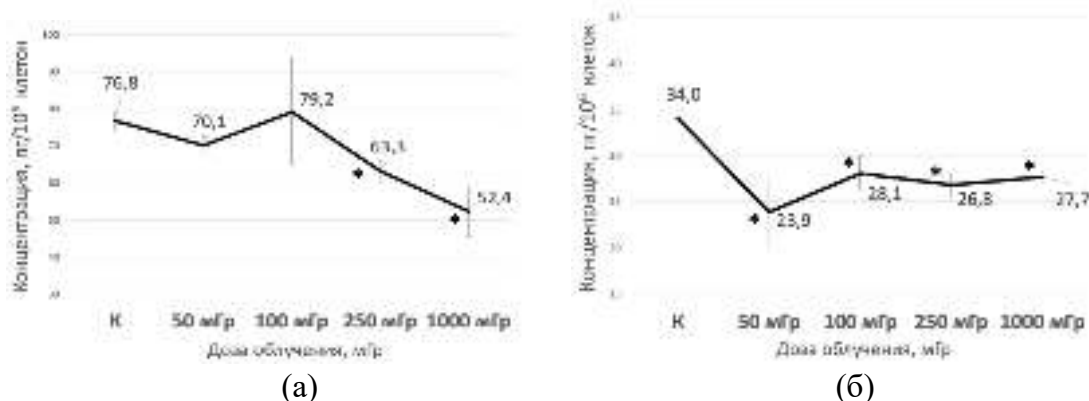


Рисунок 8. Зависимость концентрации ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ: (а) – через 43 дня после облучения. (б) – через 64 дня после облучения. 1

* ($p < 0,05$) – 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 8б).

Также изменения наблюдались для концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах облученных МСК (Таблица 6).

Таблица 6. 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. В то же время для групп клеток, облученных средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр, наблюдалось повышение концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах (Рисунок 10б). В целом, была отмечена зависимость доза-эффект.

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, в то же время для группы клеток, облученной средней дозой ИИ 250 мГр, наблюдалось еще более существенное повышение концентрации ИЛ-8 (Рисунок 9а). Концентрация ИЛ-8 для групп МСК, облученных дозами 100 и 1000 мГр, оставалась сравнима с концентрацией необлученной группы контроля.

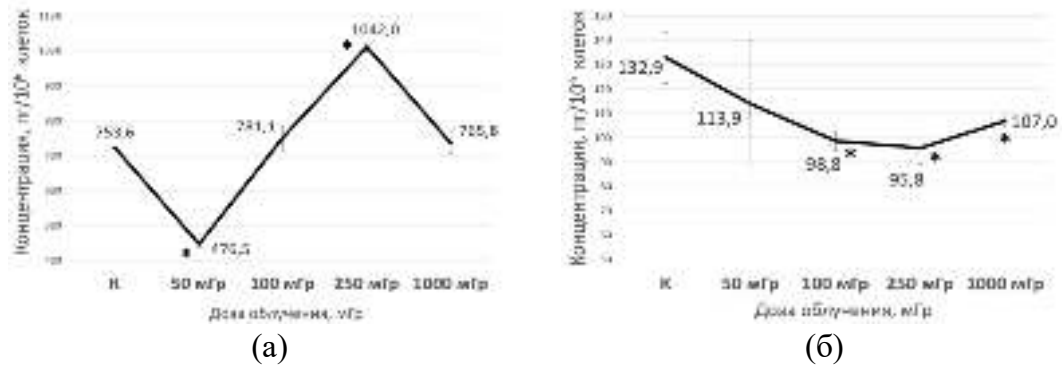


Рисунок 9. Зависимость концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ: (а) – через 9 дней после облучения. (б) – через 64 дня после облучения.

* ($p < 0,05$) – 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. Также через 43 дня после облучения концентрация ИЛ-8 снижалась для группы МСК, облученной малой дозой ИИ 50 мГр. 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 9б).

Также изменения наблюдались для концентрации VEGF-A в кондиционированных средах облученных МСК (Таблица 7).

Таблица 7. 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 (Рисунок 10в). Группа МСК, облученная малой дозой ИИ 50 мГр, демонстрировала снижение концентрации VEGF-A в кондиционированной среде, в то же время в группах МСК, облученных малой и средней дозой ИИ – 100 и 250 мГр наблюдалось повышение концентрации VEGF-A.

Через 9 дней после облучения статистически достоверное повышение концентрации VEGF-A относительно необлученной группы контроля сохранялось для МСК, облученных малой дозой ИИ 100 мГр, в тоже время группа МСК, облученная средней дозой ИИ 1000 мГр, демонстрировала снижение концентрации VEGF-A в кондиционированной среде.

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.

Таким образом, 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 [Schröder S., 2018, Chen SL., 2000]. 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 показало, 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 10 а,б).

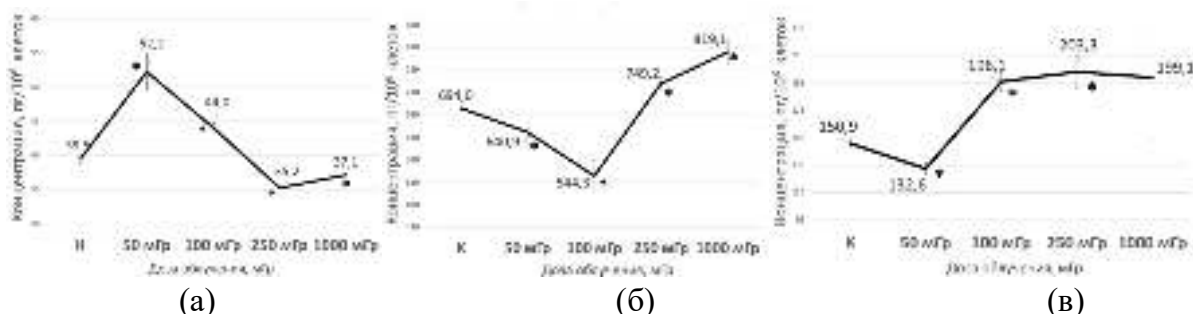


Рисунок 10. (а) - зависимость концентрации ИЛ-6 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения, (б) - зависимость концентрации ИЛ-8 в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения, (в) - зависимость концентрации VEGF-A в кондиционированных средах МСК от полученной дозы ИИ через 48 часов после облучения.

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

На основании литературных данных выявленные закономерности можно объяснить вовлеченностью в регуляцию экспрессии как ИЛ-6, так и ИЛ-8 транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1, поскольку промоторы генов данных интерлейкинов содержат сайты связывания для них. Однако наблюдаемые закономерности изменения концентраций ИЛ-6 и ИЛ-8 в представленном исследовании описаны впервые и, в частности, могут быть объяснены, особенностями радиочувствительности МСК слизистой ткани десны человека, видом и мощностью используемого ИИ, а также 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 влиянием облучения в малых (50 и 100 мГр) и средних (250 и 1000 мГр) дозах рентгеновским излучения.

Через 48 часов после облучения концентрация VEGF-A (способного помимо регуляции процессов ангиогенеза оказывать иммуносупрессивное действие (Bernal A., 2013)) 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 10в). Таким образом, наблюдаемые изменения подкрепляют выводы о развитии противоположных воспалительных реакций МСК под влиянием облучения малыми и средними дозами ИИ.

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 малых доз 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.

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 облучения – $9,4 \pm 0,36$ ($p < 0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – $6,4 \pm 0,75$ (Рисунок 11а). В то же время для групп МСК, облученных в дозах 100, 250 и 1000 мГр наблюдалось снижение пролиферативной активности (Рисунок 11 а,б).

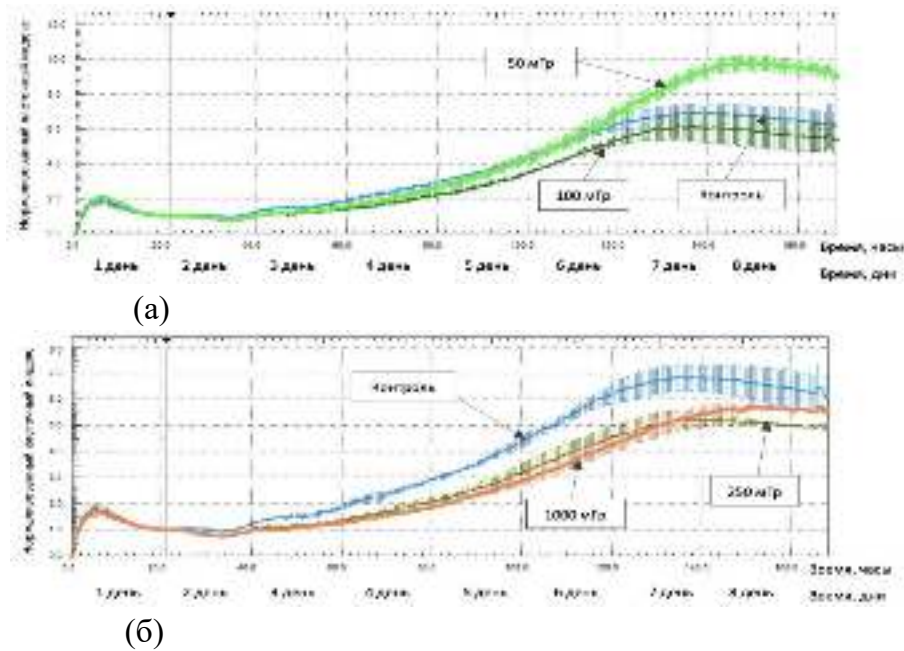


Рисунок 11. Динамика пролиферативной активности МСК с 1 дня после облучения в дозах: (а) – 50мГр (светло-зеленый) и 100мГр (темно-зеленый), (б) – 250мГр (зеленый) и 1000мГр (оранжевый).

В исследовании состава клеточных поколений через 24 (1 день), 48 (2 день), 72 (3 день) и 96 (4 день) часов после облучения (Таблица 8), 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. Подобные изменения могут указывать на появление в составе популяции МСК, облученной малой дозой ИИ 100 мГр, субпопуляции клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности.

Таблица 8. 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
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.

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 облучения – $7,4 \pm 0,77$ ($p < 0,05$) в сравнении с необлученной группой контроля – $4,3 \pm 0,53$. В то же время для групп МСК, облученных в дозах 100, 250 и 1000 мГр, интенсивность пролиферативная активность оставалась сравнима с необлученной группой контроля.

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 12).

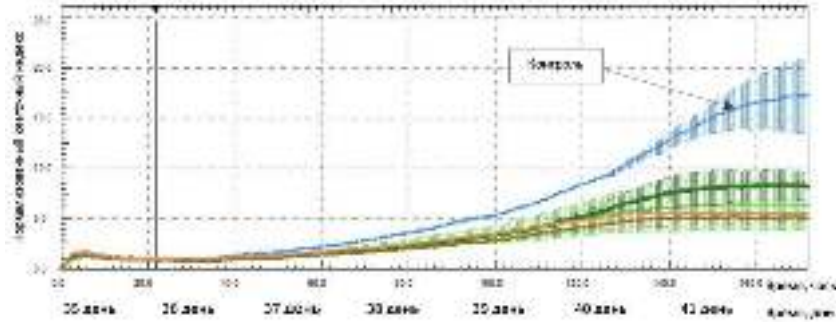


Рисунок 12. Динамика пролиферативной активности МСК с 35 дня после облучения в дозах 50мГр (светло-зеленый), 100мГр (темно-зеленый), 250мГр (зеленый) и 1000мГр (оранжевый).

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 9). 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.

Таблица 9. Количество МСК со сниженной интенсивностью флуоресценции через 29, 30, 31 и 32 дня после облучения.

Параметр	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.

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. 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 субпопуляции клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности, 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 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 группы клеток демонстрировали пролиферативную активность, сравнимую с необлученной группой контроля.

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 человека. 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 роста, 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. Вероятно, это связано с тем, что вклад данных клеток с повышенной интенсивностью пролиферативной активности в общую конfluence 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 снижении 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.

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 культур МСК 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 13а). Увеличение значений НКИ отмечалось вплоть до 175 часов после внесения кондиционированной среды – $7,0 \pm 1,71$ ($p < 0,05$) в сравнении с группой контроля – $4,9 \pm 0,00$.

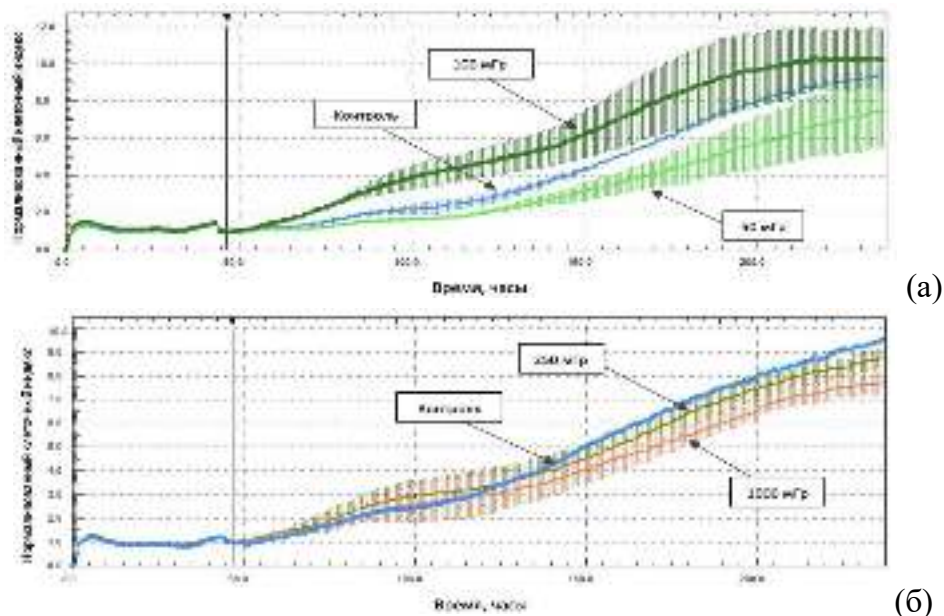


Рисунок 13. Динамика пролиферативной активности необлученных МСК при их культивировании в кондиционированных средах МСК, полученных через 48 часов после облучения клеток в дозах: (а) – 50 мГр (светло-зеленый) и 100 мГр (темно-зеленый), (б) – 250 мГр (зеленый) и 1000 мГр (оранжевый).

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 13 а, б).

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. Увеличение значений НКИ отмечалось вплоть до 227 часов после внесения кондиционированной среды – $6,7 \pm 0,31$ ($p < 0,05$) в сравнении с группой контроля – $5,6 \pm 0,2$. Для остальных групп кондиционированных сред, полученных от облученных клеток (50, 250 и 1000 мГр) уровень пролиферативной активности необлученных клеток оставался на уровне группы контроля. 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, 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. Таким образом, результаты представленного исследования демонстрируют снижение пролиферативной активности МСК при облучении средними дозами ИИ 250 и 1000 мГр наряду со снижением 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 влиянием 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. Облучение МСК малой дозой ИИ 100 мГр приводит к снижению пролиферативной активности, однако факторы кондиционированной среды, полученной от данной групп клеток через 48 часов после облучения, усиливают пролиферативную активность 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 после облучения МСК перестают секретировать факторы, образование которых опосредовано влиянием ИИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 ранние сроки 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 – $52,2 \pm 2,75$ пг/ 10^6 клеток ($p < 0,05$) и $44,0 \pm 0,74$ пг/ 10^6 клеток ($p < 0,05$), соответственно, и снижению концентрации ИЛ-8 – $640,9 \pm 9,60$ пг/ 10^6 клеток ($p < 0,05$) и $544,3 \pm 34,77$ 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 – $35,2 \pm 0,56$ пг/ 10^6 клеток и $37,1 \pm 0,00$ пг/ 10^6 клеток ($p < 0,05$), соответственно, и повышению концентрации ИЛ-8 – $749,2 \pm 12,73$ пг/ 10^6 клеток и $819,1 \pm 29,19$ 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) – $13,2 \pm 1,53\%$ ($p < 0,05$). 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) малыми дозами ИИ 50 и 100 мГр, отличаются от эффектов оказываемые факторами кондиционированных сред, полученных от МСК в ранние сроки культивирования после облучения (48 часов) 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Усупжанова Д.Ю.**, Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Брунчуков В.А., Самойлов А.С. Мезенхимальные стромальные клетки человека: радиочувствительность и эффекты низких доз радиации. Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2022. Т.67, №1. С.103-110.
2. **Усупжанова Д.Ю.**, Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Никитина В.А., Сучкова Ю.Б., Брунчуков В.А., Расторгуева А.А., Брумберг В.А., Бушманов А.Ю., Самойлова А.С. Анализ эффектов низких доз радиации на мезенхимальные стволовые клетки человека. Медицинская радиология и радиационная безопасность, 2020. Т.65, №6. С.5-10.
3. Nikitina V.A., Astrelina T.A., Kobzeva I.V., Nugis V.Y., Lomonosova E.E., Semina V.V., Brunchukov V.A., **Usupzhanova D.Y.**, Brumberg V.A., Rastorgueva A.A., Karaseva T.V., Samoylov A.S. Cytogenetic characteristics of diploid lines of mesenchymal multipotent stromal cells. Cell and Tissue Biology, 2021. Vol.15(6). С. 604-615.
4. Никитина В.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Нугис В.Ю., Ломоносова Е.Е., Семина В.В., Брунчуков В.А., **Усупжанова Д.Ю.**, Брумберг В.А., Расторгуева А.А., Карасева Т.В., Самойлов А.С. Цитогенетическая характеристика диплоидных линий мезенхимных мультипотентных стромальных клеток. Цитология, 2021. Т.63, №3. С. 207-220.
5. Nikitina V, Astrelina T, Nugis V, Ostashkin A, Karaseva T, Dobrovolskaya E, **Usupzhanova D**, Suchkova Y, Lomonosova E, Rodin S, Brunchukov V, Lauk-Dubitskiy S, Brumberg V, Machova A, Kobzeva I, Bushmanov A, Samoilov A. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. PLoS One, 2018. Vol. 13(2): e0192445.
6. Pustovalova M, Astrelina T, Grekhova A, Vorobyeva N, Tsvetkova A, Nikitina V, Suchkova Yu, **Usupzhanova D**, Brunchukov V, Kobzeva I, Karaseva T, Blokhina T, Ozerov I, Samoylov A, Bushmanov A, Leonov S, Zhavoronkov A, Osipov A. Persistent γ 2ax 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, 2017. Vol. 9(11): 2397-2410.
7. Pustovalova M, Grekhova A, Astrelina T, Nikitina V, Dobrovolskaya E, Suchkova Yu, Kobzeva I, **Usupzhanova D**, Vorobyeva N, Samoylov A, Bushmanov A, Ozerov I, Zhavoronkov A, Leonov S, Klovov D, and Osipov A. Accumulation of spontaneous γ H2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells. Aging, 2016. Vol. 8(12): 3498-3506.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген
 ДМСО – диметилсульфоксид
 ИИ – ионизирующее излучение
 ИЛ – интерлейкин
 мГр – миллиГрей
 МСК – мезенхимальные стромальные клетки
 НКИ – нормализованный клеточный индекс
 CD – кластер дифференцировки