

**И.И. Еремин¹, А.Ю. Бушманов¹, А.В. Аклеев^{2,3}, Г.П. Димов²,
А.А. Пулин¹, И.Н. Корсаков¹, П.С. Еремин¹, Н.Л. Лазарева¹, В.Л. Зорин¹,
К.В. Котенко¹**

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ

**I.I. Eremin¹, A.Yu. Bushmanov¹, A.V. Akleyev^{2,3}, G.P. Dimov², A.A. Pulin¹,
I.N. Korsakov¹, P.S. Eremin¹, N.L. Lazareva¹, V.L. Zorin¹, K.V. Kotenko¹**

The Influence of Ionizing Radiation on Fibroblasts' Secretion and Proliferation

РЕФЕРАТ

Цель: Изучение влияния хронического воздействия ионизирующего излучения на секреторный и пролиферативный потенциал фибробластов.

Материал и методы: Изучены пролиферативный потенциал и секреторная активность фибробластов, полученных от лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию во время проживания на радиоактивно-загрязненных территориях вдоль реки Течи (10 образцов), а также необлученных добровольцев (10 образцов). Пролиферативная активность фибробластов изучалась путем определения клеточного и нормализованного клеточного индекса дельта, а также угла наклона кривой на стадии экспоненциального роста, секреторная активность оценивалась по концентрации в культуральной жидкости фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкина 6 (ИЛ-6), нейротрофического фактора мозга (BDNF) и фактора роста фибробластов.

Результаты: Установлена значимо ($p < 0,05$) более высокая концентрация VEGF и BDNF у необлученных добровольцев по сравнению с лицами, подвергшимися радиационному воздействию. Концентрация ИЛ-6 и время удвоения клеточной популяции были значимо выше у последних. Показана зависимость пролиферативной активности фибробластов от дозы ионизирующего излучения: более высокие значения времени удвоения клеточной популяции у лиц, подвергшихся воздействию меньших доз ионизирующего излучения. Установлено наличие корреляционных связей между дозой излучения и секреторной и пролиферативной активностью фибробластов.

Выводы: Накопленная доза излучения на мягкие ткани и ККМ оказывает значимое влияние на секреторную активность и пролиферативный потенциал фибробластов кожи, коррелирует с сывороточными уровнями основных биохимических маркеров лиц, подвергавшихся хроническому облучению. Установлены клинично-лабораторные параметры, имеющие корреляционную связь с показателями пролиферативной и секреторной активности, которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях при создании расчетного индекса пролиферативного потенциала.

Ключевые слова: клеточный индекс, фибробласты кожи, хроническое радиационное воздействие, экспериментальная модель

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the influence of the ionizing radiation on fibroblasts' secretion activity and their proliferative potential.

Material and methods: Secretion activity and proliferative potential of fibroblasts gained from chronically exposed to ionizing radiation people (10 specimens) and healthy donors (10 specimens) were studied. Cell index, normalized cell index delta, and slope of the exponential growth curve were calculated, concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-6 (IL-6), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and fibroblast growth factor (FGF) in the cultural media were determined.

Results: Higher concentration of VEGF and BDNF in cultural fluid of fibroblasts gained from healthy volunteers was found. Concentration of IL-6 and cell doubling time were greater in patients' exposed to ionizing radiation. Cell doubling time was bigger for fibroblasts gained from patients with lower dose of irradiation. It was found that there is the correlation between the dose of ionizing radiation and the fibroblasts' secretion activity and proliferative potential.

Conclusion: Ionizing radiation affects fibroblasts' secretion and proliferation on dose-dependent manner.

Key words: cell index, skin fibroblasts, chronic radiation exposure, experimental model

¹ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва. E-mail: cd105@mail.ru

² Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России

³ Челябинский государственный университет, Челябинск

¹ A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of FMBA, Moscow, Russia. E-mail: cd105@mail.ru

² Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk region, Russia

³ Chelyabinsk State University, Russia

Введение

В последнее время отмечается повышение радиационного воздействия на человека как от естественных, так и от искусственных источников. Повышение уровня естественного ионизирующего излучения связывается с неблагоприятным антропогенным воздействием на окружающую среду. Повышение искусственного радиационного воздействия связывается с учащающимся его использованием в противоопухолевой терапии, при рентгенологических исследованиях, с антропогенным загрязнением отходами и побочными продуктами атомной энергетики [1]. Чрезмерное воздействие ионизирующего излучения вызывает нарушения на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях и может обусловить, таким образом, развитие клинически значимой патологии [2].

При воздействии ионизирующего излучения, в отличие от других физических факторов, обнаруживается разная чувствительность (радиочувствительность) отдельных органов и тканей. Их повреждения выявляются лишь после достижения определенной для каждой ткани (органа) пороговой дозы, а по времени — после некоторого скрытого периода, длительность которого для каждой ткани зависит еще и от продолжительности цикла клеточного обновления [3]. Радиационная гибель фибробластов и мультипотентных мезенхимальных клеток, радиочувствительность которых достаточно велика [4], рассматривается как основная причина изменения функциональных особенностей кожи.

Фибробласты обеспечивают морфофункциональную организацию кожи не только в физиологических условиях, но и при патологии — активно участвуют в восстановлении её целостности после повреждений [5, 6]. Состояние фибробластов признано ключевым фактором развития злокачественных новообразований [7]. Фибробласты продуцируют комплекс биологически активных веществ: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкин 6 (IL-6), нейротрофический фактор мозга (BDNF), фактор роста фибробластов (FGF), благодаря чему осуществляется регуляторная и репаративная функции, а также реализуется их роль в патологических процессах [7, 8].

Таким образом, хроническое радиационное воздействие может оказывать негативное влияние на состояние фибробластов и обуславливать нарушение гомеостаза кожи, течение раневого процесса, преждевременное ее старение, а также развитие злокачественных новообразований.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния хронического воздействия ионизирующего излучения на секреторный и пролиферативный потенциал фибробластов.

Материал и методы

Исследование выполнено с использованием фибробластов кожи, полученных от лиц, подвергшихся воздействию хронического ионизирующего излучения во время проживания на радиоактивно-загрязненных территориях вдоль реки Течи — 10 образцов, полученных от 10 пациентов. Образцы были разделены на группы в зависимости от накопленной пациентом дозы излучения на мягкие ткани: до 0,01 Гр (группа 1.1); больше 0,01 Гр (группа 1.2) и накопленной дозы на красный костный мозг (ККМ): 1а группа — до 0,031 Гр; 1б группа — 0,042 — 1,5 Гр.

Характеристика обследованного контингента представлена в табл. 1. Сопутствующая патология в группе была представлена распространенными в популяции нозологическими формами. У обследованных пациентов не было зарегистрировано заболеваний, которые могли бы значимым образом влиять на состояние фибробластов кожи.

Таблица 1

Характеристика [% (абс.)] исследуемого контингента

Признак	Градация	Облученные
Национальность	Тюрки	52
	Славяне	48
Пол	Мужчины	30
	Женщины	70
Всего		100
Средний возраст, лет		66,4 ± 2,0
Средняя накопленная доза на мягкие ткани, Гр		0,035 ± 0,01
Средняя накопленная доза на ККМ, Гр		0,58 ± 0,14

Образцы крови брали у добровольцев только после подписания «Информированного согласия». Одновременно получали «Согласие на обработку персональных данных» (Федеральный закон от 27.07.2006 № 152-ФЗ «О персональных данных»).

В качестве контроля использовались образцы, полученные от 10 необлученных добровольцев — группа 2.

В исследование не включались пациенты при наличии у них аутоиммунных заболеваний, признаков острых или хронических инфекционных заболеваний, лихорадочных состояний, онкологических заболеваний в анамнезе, хронических заболеваний печени и почек в стадии обострения, а также пациенты, проходившие обследование или получавшие лечение при помощи рентгенологических методов в течение 6 месяцев до включения в исследование.

Забор биоматериала, выделение первичной культуры, наращивание клеточной массы, составление иммунофенотипического профиля, а также криоконсервирование полученной культуры были выполнены

в рамках научно-исследовательской работы «Оценка онкогенного потенциала фибробластов кожи лиц, подвергающихся хроническому воздействию ионизирующего излучения, с помощью экспериментальной модели».

Для расчета контрольных точек в исследование были включены культуры фибробластов, выделенные из биоптатов кожи 10 необлученных добровольцев, не подвергавшихся воздействию хронического ионизирующего излучения. После подписания информированного согласия донору под местной анестезией 2 % раствором лидокаина проводился срез кожи в заушной области площадью 2×2 мм и помещался в среду для транспортировки (DMEM 1000 mg D-glucose, 5 % FBS, антибиотики). Биоптаты немедленно доставлялись в лабораторию. Выделение первичной культуры, наращивание клеточной массы, а также криоконсервирование проводились по той же методике, которая использовалась для экспериментальной группы.

Ткани биоптатов подвергали ферментативной обработке коллагеназой II типа и полученные суспензии одиночных фибробластов культивировали при 37 °С, 5 % CO₂ в стандартной культуральной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (StemCellTechnology, США) с добавлением 2 мМ L-глутамина (StemCellTechnology, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (StemCellTechnology, США) и 20 % FBS (BiologicalIndustries, Израиль) в течение 14 сут. В дальнейшем клетки снимали с поверхности флаконов 0,05 % раствором трипсина и пассировали с плотностью 10⁴ клеток/см² в той же культуральной среде, но с уменьшенным до 10 % содержанием FBSdef. Клетки пассировали при достижении культурой 80–90 % монослоя. Замену среды осуществляли каждые 3 сут. В работе использовали культуральную посуду фирмы Corning-Costar (США), реактивы фирмы Sigma (США).

Ранее заготовленные криопробирки с культурами клеток фибробластов быстро размораживали при 37 °С, затем, медленно перемешивая, добавляли по капле стандартную культуральную среду. Оценка жизнеспособности клеток проводилась на автоматическом счетчике клеток Countess (Invitrogen, США). После разморозки жизнеспособность клеток во всех образцах составляла не менее 92 %. Клетки культивировали в течение 3 сут в полной среде.

В дальнейшем экспериментальные и контрольные культуры снимали с пластика раствором трипсина с 0,25 % ЭДТА (StemCellTechnology, США), инактивацию трипсина и отмывку клеток проводили в полной среде. Клетки пассировали на 16-луночные планшеты с позолоченными микроэлектродами (ACEA Biosciences, США) в клональной плотности 15×10³ кл/см. Для оценки пролиферативной актив-

ности клеток планшеты помещались в клеточный анализатор xCELLigence (ACEA Biosciences, США) при 37 °С, 5 % CO₂. Исследование проводилось в течение 20 сут, при этом показания с прибора снимались в непрерывном режиме. Фиксировались основные параметры, характеризующие пролиферативную активность клеточной культуры: клеточный и нормализованный клеточный индекс дельта (DCI и NDCI), а также угол наклона кривой на стадии экспоненциального роста (Slope).

Для оценки секреторной активности фибробласты высевали в культуральную посуду и культивировали в полной среде при 37 °С и 5 % CO₂. Смену среды осуществляли каждые 3 дня. При достижении культурой 100 % конфлюэнтности производили полную смену среды и культивировали клетки еще 3 сут. Полученную кондиционированную среду аккуратно отбирали в отдельные промаркированные пробирки и замораживали при –20 °С. После получения образцов кондиционированных сред от всех исследуемых культур фибробластов проводили оценку секреторной активности клеток в культуральной среде с использованием ИФА-наборов R&D Systems (США) по методике производителя. Исследовали основной комплекс биологически активных веществ, которые продуцируют фибробласты: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), интерлейкин 6 (IL-6), нейротрофический фактор мозга (BDNF), фактор роста фибробластов (FGF).

В лунки планшета с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов. В один стрип вносили по 50 мкл калибровочных и контрольного образца, в остальные лунки добавляли по 50 мкл исследуемой культуральной среды. Стрипы закрывали пленкой и оставляли инкубироваться 2 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации снимали липкую пленку и добавляли по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Закрывали пленкой, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации лунки стрипов промывали отмывочным буфером 5 раз. В каждую лунку вносили по 200 мкл рабочего раствора субстрата, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации вносили во все лунки с той же скоростью по 50 мкл стоп-реагента. Результаты регистрировали при помощи спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр — 450 нм, референс-фильтр — в диапазоне 540–570 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не превышало 5 мин. Для расчета результатов строили в линейных координатах калибровочный график зависимости

Таблица 2

Фенотипический профиль экспрессии поверхностных маркеров фибробластов

Антитела	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Референсные значения
CD13	93,5	96,2	95,9	94,2	96,1	93,9	94,7	96,5	95,8	94,8	≥95 %
CD 14	0,1	0,2	0,5	0,2	0,4	0,3	0,1	0,6	0,2	0,4	Большая часть Ф/б не экспрессирует
CD 34	0,4	1,6	1,2	0,8	0,6	1,1	0,9	0,4	0,7	0,6	≤2 %
CD 44	97,5	93,5	94,8	92,1	96,2	97,1	96,1	94,5	93,9	92,9	≥95 %
CD 45	1,4	1,1	0,7	1,8	0,6	0,8	1,2	0,4	0,7	1,5	≤2 %
CD 54	3,4	4,4	3,8	2,1	7,2	6,1	5,4	3,2	2,6	3,9	Большая часть Ф/б не экспрессирует
CD 90	98,7	99,6	96,4	98,2	98,9	97,1	97,8	95,4	98,3	95,9	≥95 %
CD 105	98,4	99,4	98,8	99,1	98,3	98,7	99,3	99,1	98,6	98,5	≥95 %
CD 117	0,2	0,1	0,3	0,6	0,2	0,4	0,1	0,7	0,5	0,4	Большая часть Ф/б не экспрессирует
CD 73	96,8	95,8	96,2	97,8	97,4	95,9	96,3	96,7	97,6	98,1	≥95 %

оптической плотности от концентрации цитокина в калибровочных образцах.

Статистическая значимость различий между группами по количественным признакам оценивалась по U-критерию Манна–Уитни. Анализ корреляционных связей изученных параметров проведен путем расчета рангового коэффициента корреляции Спирмена, пропущенные данные удалялись попарно, корреляции считались значимыми при $p < 0,05$.

Данные представлены в терминах «медиана (межквартильный интервал)».

Результаты и обсуждение

Для подтверждения чистоты клеточных культур контрольной группы составили иммунофенотипический профиль культивированных фибробластов кожи. Фибробласты имели высокий уровень экспрессии CD44, CD116, CD13, CD90, CD105, CD73, не экспрессировали маркеры прогениторных, гемопоэтических (CD34, CD45, CD14, CD117) клеток, а также имели низкий уровень экспрессии молекулы адгезии (CD54) (табл. 2).

При сравнении показателей секреторной и пролиферативной активности фибробластов у необлученных добровольцев (группа 2) и пациентов, подвергшихся хроническому воздействию ионизирующего излучения (группа 1) выявлены значимо ($p < 0,05$) более высокие значения концентрации VEGF и BDNF у необлученных добровольцев: 168,3 (150,5–201,15) пг/мл и 80,9 (56,7–93,2) пг/мл соответственно по сравнению с пациентами 1 группы: 35,8 (7,0–297,7) пг/мл и 7,91 (0,00–38,33) мг/мл. Концентрация IL-6 в культуральной среде фибробластов, полученных от необлученных добровольцев была, напротив, значимо ($p < 0,05$) ниже: 26,3 (19,6–33,67) пг/мл против 131,7 (5,09–252,0) пг/мл у лиц, перенесших воздействие ионизирующего излучения. Время удвоения клеточной популяции было значимо выше у пациентов 1 группы: 170,35 (125,0–334,0) ч против 109,2 (99,5–120,9) ч у необлученных добровольцев.

При изучении влияния дозы ионизирующего излучения на мягкие ткани на секреторную и пролиферативную активность фибробластов выявлены значимо ($p < 0,05$) более высокие показатели времени удвоения клеточной популяции у лиц с меньшей дозой облучения (группа 1.1) 233,9 (177,7–250,0) ч по сравнению с лицами, подвергшимися воздействию более высоких доз (группа 1.2) — 143,0 (132,4–163,3) ч (рис. 1).

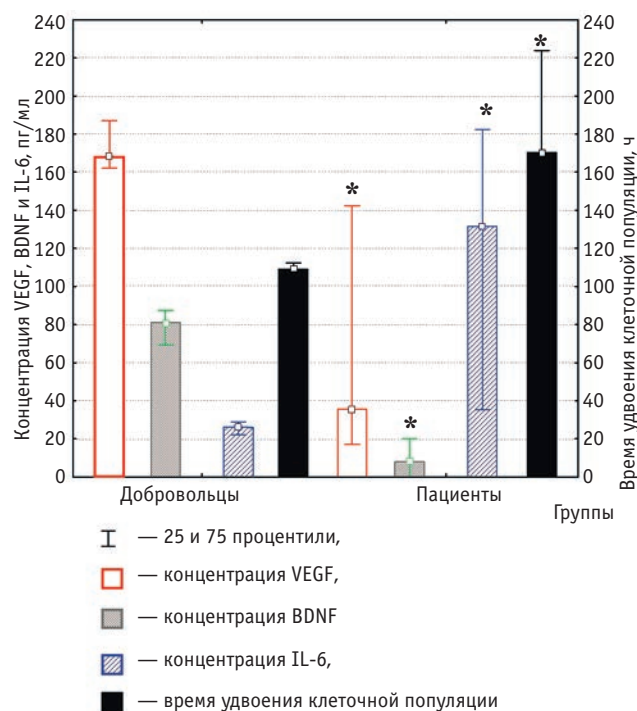


Рис. 1. Влияние ионизирующего облучения на показатели секреторной и пролиферативной активности фибробластов кожи.

Примечания: Добровольцы — необлученные здоровые добровольцы; пациенты — пациенты, подвергнутые хроническому воздействию ионизирующего излучения, маркер — медиана.

* — $p < 0,05$, U-критерий Манна–Уитни по сравнению со значениями, полученными в группе 1

При сравнении показателей пролиферативной и секреторной активности фибробластов пациентов, подвергавшихся хроническому воздействию ионизирующего излучения, выявлены более высокие значения времени удвоения клеточной популяции у лиц, подвергнутых меньшим дозам облучения (группа 1a) на ККМ: 233,9 (162,5–250,0) ч по сравнению с 163,3 (143,0–177,4) ч у группы пациентов с более высокой дозой облучения (группа 1б). Концентрация IL-6 и нейротрофического фактора мозга в культуральной среде фибробластов пациентов группы 1a также была выше: 182,41 (48,3–186,74) пг/мл и 16,66 (0,0–20,0) пг/мл соответственно по сравнению с 90,91 (35,32–172,4) пг/мл и 6,66 (5,83–9,16) пг/мл у лиц группы 1б, вместе с тем, различия в группах не достигали уровня статистической значимости.

Анализ корреляционных связей изученных параметров выявил значимые ($p < 0,05$) корреляционные зависимости параметров, характеризующих пролиферативную и секреторную активность фибробластов и полученных доз ионизирующего облучения: выявлены сильные обратные корреляционные связи между концентрацией BDNF и дозой излучения на мягкие ткани (–0,71) и ККМ (–0,73), связи средней силы между временем удвоения клеточной популяции и дозой излучения на мягкие ткани (0,54) и ККМ (0,67), также между стадией экспоненциального роста культуры клеток (Slope) и дозой излучения на мягкие ткани (–0,45).

Существенный интерес представляют выявленные связи между полученными дозами облучения и концентрацией в плазме крови триглицеридов низкой плотности: –0,52 для связи с дозой облучения на мягкие ткани и –0,58 для связи с дозой на ККМ, а также корреляционной связи концентрации белка и полученных пациентом доз облучения на мягкие ткани (–0,46) и ККМ (–0,50). Указанные показатели, в свою очередь, имеют корреляционную связь (от средней до сильной) с показателями пролиферативной активности фибробластов: концентрация липопротеинов низкой плотности обратно коррелирует с концентрацией VEGF (–0,80), BDNF (–0,63) в культуральной жидкости и углом наклона кривой на стадии экспоненциального роста (Slope) (–0,60) и прямо коррелирует со временем адгезии (0,63), концентрация белка показала обратную корреляционную связь с VEGF (–0,40), IL-6 (–0,40), FGF (–0,40), временем адгезии (–0,94) и DT (–0,60) и прямую с FGF (0,40). Указанные связи также не были статистически значимыми.

Кроме того, были установлены значимые ($p < 0,05$) связи между углом наклона кривой на стадии экспоненциального роста (Slope) и концентрацией триглицеридов (–0,89), IL-6 и концентраци-

ей креатинина (0,71) и систолическим АД (–0,84), между BDNF и концентрацией билирубина (–0,76) и липопротеинов высокой плотности (–0,63), между VEGF и концентрацией липопротеинов высокой плотности (–0,75).

Выводы

Накопленная доза излучения на мягкие ткани и ККМ оказывает значимое влияние на секреторную активность и пролиферативный потенциал фибробластов кожи, коррелирует с сывороточными уровнями основных биохимических маркеров лиц, подвергавшихся хроническому облучению. Установлены клинично-лабораторные параметры, имеющие корреляционную связь с показателями пролиферативной и секреторной активности, которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях при создании расчетного индекса пролиферативного потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coleman C.N., Blakely W.F., Fike J.R. et al. Molecular and cellular biology of moderate-dose (1–10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17–18, 2001. // *Radiat. Res.*, 2003, **159**, No. 6, P. 812–834.
2. Khan A.R., Rana P., Devi M.M. et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabonomic investigation of biochemical effects in serum of γ -irradiated mice. // *Int. J. Radiat. Biol.*, 2011, **87**, No. 1, P. 91–97.
3. Sokolov M., Neumann R. Lessons learned about human stem cell responses to ionizing radiation exposures: a long road still ahead of us. // *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, No. 8, P. 15695–15723.
4. Kwon Y.K., Ha I.J., Bae H.W. et al. Dose-dependent metabolic alterations in human cells exposed to gamma irradiation. // *PLoS One*, 2014, **9**, No. 11.
5. Darby I.A., Laverdet B., Bonté F., Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2014, **6**, No. 7, P. 301–311.
6. Darby I.A., Hewitson T.D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. // *Int. Rev. Cytol.*, 2007, **257**, P. 143–179.
7. Kalluri R., Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. // *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, No. 5, P. 392–401.
8. Nedoszytko B., Sokółowska-Wojdyło M., Ruckemann-Dziurdzińska K. et al. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. // *Postepy. Dermatol. Alergol.*, 2014, **2**, P. 84–91.

Поступила: 12.12.2014

Принята к публикации: 19.12.2014