

Д.В. Салеева¹, Л.М. Рождественский¹, Н.Ф. Раева¹, Е.С. Воробьева¹, Г.Д. Засухина^{1,2}

МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ МАЛЫХ ДОЗ РАДИАЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С АКТИВАЦИЕЙ ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ КЛЕТКИ

¹Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Контактное лицо: Дарья Владиславовна Салеева, e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

РЕФЕРАТ

Обоснование: В клетках, подвергающихся воздействию ионизирующего излучения, активируется ряд сложных реакций, включающих повреждение и репарацию ДНК, гибель клеток, изменение уровня пролиферации. В течение многих лет проводилось большое количество *in vivo* исследований активности генов и их регуляторов в клетках млекопитающих с перевивной опухолью в ответ на воздействие высоких доз ионизирующего излучения. До сих пор остается менее исследованным, как малые дозы ионизирующего излучения влияют на указанные процессы. Рядом авторов показано, что воздействие малых доз приводит к различным положительным реакциям клетки и организма в целом: активация иммунной системы, генов и их регуляторов в феномене гормезиса, формирование адаптивного ответа. Эти наблюдения определили цель работы: исследовать активность генов и некодирующих РНК (длинных некодирующих РНК и микроРНК) в различных органах мышей с трансплантированной карциномой Льюиса при облучении в малых дозах.

Материал и методы: 24 самкам мышей C57Bl/6 трансплантировали подкожно в правую заднюю лапу суспензию диспергированных опухолевых клеток (карцинома Льюиса 10⁵ клеток в 0,2 мл р-ра Хенкса). Тотальное 4-кратное рентгеновское облучение с интервалом 4 дня в дозе 0,075 Гр (0,85 Гр/мин) производили на аппарате РУСТ М1 начиная с 6-ых суток после трансплантации, при этом ежедневно измеряли размеры опухоли. Мыши были распределены на следующие группы: биоконтроль, биоконтроль+облучение, опухоль и опухоль+облучение. На 19-е сутки от начала эксперимента мышей подвергали эвтаназии. В костном мозге, тимусе, селезенке и опухоли мышей определяли профили экспрессии мРНК генов, длинных некодирующих РНК и микроРНК, контролирующих ответ на действие радиации.

Результаты: Фракционированное облучение мышей с трансплантированной карциномой Льюиса в малых дозах приводило к снижению скорости роста имплантированной опухоли по сравнению с аналогичной группой без облучения. В то же время отмечалась активация онкосупрессоров, и снижение активности онкогенов в тимусе и селезенке мышей с опухолью и облучением. В группе «опухоль» без облучения, количество активированных онкогенов превалировало над количеством инактивированных.

Заключение: Таким образом, действие малых доз радиации приводило к активации противоопухолевого иммунитета у мышей, что проявлялось в замедлении роста опухоли у животных и отражалось в индукции онкосупрессоров и ингибировании экспрессии онкогенов.

Ключевые слова: малые дозы радиации, карцинома Льюиса, некодирующие РНК, онкогены, онкосупрессоры, мыши

Для цитирования: Салеева Д.В., Рождественский Л.М., Раева Н.Ф., Воробьева Е.С., Засухина Г.Д. Механизмы противоопухолевого действия малых доз радиации, связанные с активацией защитных систем клетки // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2023. Т. 68. № 1. С. 15–18. DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-1-15-18

D.V. Saleeva¹, L.M. Rozhdestvensky¹, N.F. Raeva¹, E.S. Vorobeveva¹, G.D. Zasukhina^{1,2}

Mechanisms of Antitumor Activity of Low Doses of Radiation Associated with Activation of Cells' Defense System

¹A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

²Institute of General Genetics, Moscow, Russia

Contact person: D.V. Saleeva, e-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

ABSTRACT

Background: The effects of ionizing radiation (IR) involve a highly orchestrated series of events in cells, including DNA damage and repair, cell death, and changes in the level of proliferation associated with the stage of the cell cycle. A large number of existing studies in literature have examined the activity of genes and their regulators in mammalian cells in response to high doses of ionizing radiation. Although there are many studies, the research in effect of low doses of ionizing radiation remains limited. Though much progress has been made in understanding the basic principles of effects of low doses radiation on individual components of biological systems, less is known about how low doses affect target molecules and regulate the cellular networks (e.g., activation of the immune system, genes and their regulators in the phenomenon of hormesis, the formation of an adaptive response). These observations determined the purpose of the work: to investigate the activity of genes and non-coding RNAs (long non-coding RNAs and microRNAs) in various organs of mice with transplanted Lewis carcinoma after low doses radiation.

Material and methods: 24 female mice C57Bl/6 were transplanted subcutaneously with Lewis carcinoma cells (10⁵ cells in 0.2 ml of Hanks' solution). Total 4-fold X-ray irradiation with an interval of 4 days at a dose of 0.075 Gy (0.85 Gy/min) was performed on the RUST M1 from 6 days after transplantation; the tumor size was measured daily. The mice were divided into the following groups: biocontrol,

biocontrol+irradiation, tumor and tumor+irradiation. On the 19th day from the beginning of the experiment, the mice were euthanized. The expression profiles of mRNA genes, long non-coding RNAs and microRNAs controlling the response to radiation were determined in the bone marrow, thymus, spleen and tumor of mice.

Results: Fractionated low doses irradiation of mice with transplanted Lewis carcinoma caused a growth decrease of implanted tumour cells compared to the similar group without irradiation. At the same time, there was an activation of oncosuppressors, and a decrease in the activity of oncogenes in the thymus and spleen of mice with tumor and irradiation. In the tumor group, without irradiation, the number of activated oncogenes prevailed over the number of inactivated ones.

Conclusion: Thus, the low doses radiation exposure led to the activation of antitumor immunity in mice, which emerged in slowing tumor growth in animals and was represented in the induction of oncosuppressors and inhibition of oncogenes expression.

Keywords: low doses of radiation, Lewis carcinoma, non-coding RNA, oncogenes, oncosuppressors, mice

For citation: Saleeva DV, Rozhdestvensky LM, Raeva NF, Vorobeva ES, Zasukhina GD. Mechanisms of Antitumor Activity of Low Doses of Radiation Associated with Activation of Cells' Defense System. Medical Radiology and Radiation Safety. 2023;68(1):15–18. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2023-68-1-15-18

Введение

Действие ионизирующего излучения на человека может быть связано с природными (космическая и солнечная энергия, источники радона) и техногенными (медицинские исследования, ядерная энергетика, инциденты на АЭС) источниками.

В современной радиобиологии проблема оценки биологических эффектов при воздействии малых доз радиации (МДР) является одной из центральных и очень важных для медико-экологического мониторинга и оценки риска, прежде всего, канцерогенного.

Было показано, что МДР (до 0,1 Гр) оказывают положительное профилактическое и терапевтическое действие при ряде патологий человека, к которым относятся воспалительные процессы, включая пневмонию, вызванную COVID-19 [1], и такие заболевания как болезнь Альцгеймера [2].

Эффективность МДР связана в первую очередь с активацией иммунной системы, а также с изменением экспрессии генов, вовлеченных в ответ на действие радиации [3,4]. Рядом авторов были показаны различия в чувствительности к хроническому облучению в малой дозе мышей линий СВА/СА и С57В1/6. Если число дифференциально экспрессирующихся генов у мышей линии СВА/СА составляло 444, то у С57В1/6 – 813 при тотальном облучении всего тела (суммарная доза 3 Гр), т.е. мыши С57В1/6 были более чувствительными по критерию ответа на действие излучения.

Целью данного исследования являлась оценка активности генов и некодирующих РНК у мышей линии С57В1/6, которым трансплантировали опухолевые клетки Льюиса, а также определение связи роста опухоли с экспрессией молекулярных показателей. Была проведена оценка соотношения числа онкосупрессоров и онкогенов в различных органах мышей на 19 день после инокуляции опухолевых клеток. Тотальное 4-кратное облучение мышей с интервалом в 4 дня осуществляли в дозе 0,075 Гр.

Материал и методы

Объекты исследования. Объектом исследования служили 24 мыши – самки линии С57В1/6 массой 20–22 г. Распределение мышей осуществляли по следующим группам: «биоконтроль» – интактные мыши (без опухоли и облучения); «биоконтроль+облучение» – мыши, облученные в МДР; «опухоль» – мыши с трансплантированной опухолью; «опухоль+облучение» – мыши с трансплантированной опухолью, подвергшиеся 4-кратному облучению в МДР.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных,

используемых для исследовательских и иных научных целей.

Трансплантация опухолевой ткани. Навеску опухоли (4 г) от мыши-донора измельчали палочкой в ступке в растворе Хенкса (24 мл) и отфильтровывали через сито. Полученную 14 %-ную суспензию диспергированной опухолевой ткани в объеме 0,2 мл вводили подкожно в правую заднюю лапу мышей (10^5 клеток в 0,2 мл р-ра Хенкса/ животное). Измерение опухоли у каждого животного производили ежедневно за исключением выходных, начиная с 10-ых сут после введения клеток, когда объем опухоли был достаточно выражен.

Облучение животных. Тотальное 4-кратное облучение мышей в дозе 0,075 Гр производили на аппарате РУСТ М1 (мощность дозы 0,85 Гр/мин) на 6, 10, 14, 18-е сут. после трансплантации опухолевых клеток. Эвтаназию мышей путем декапитации осуществляли на 19-е сут.

Костный мозг выделяли из бедренной кости в 0,8 мл среды RPMI-1640 (Sigma Aldrich), с глутамином без фенола красного, рН=7,2–7,4. Полученная суспензия костного мозга содержала $0,5-2 \times 10^6$ клеток в 0,1 мл и хранилась при -70°C до использования. Также извлекали селезенку, тимус и опухоль, которые замораживали и хранили на -70°C .

В тканях нами было исследовано 20 показателей (генов и некодирующих РНК), характерных для ответа на действие радиации, которые по своим функциональным особенностям были разделены на онкосупрессоры (*P53*, *PTEN*, *P38*, *P1NT*, *DINO*, *Insp21*) и онкогены (*NFkB* (*p50*), *NFkB* (*p65*), *IAP-1*, *IAP-2*, *G-CSF*, *TNFa*, *IkBa*, *iNOS*, *Cyclin E2*, *CTCF*, *TAL1*, *NEAT1*, *MALAT1*, *miR-21*). В качестве референсного гена использовался ген домашнего хозяйства *GAPDH*.

Подробная схема пробоподготовки, методики выделения РНК, проведение реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ, а также последовательности праймеров и программы амплификации были подробно описаны ранее [5].

Изученные генетические показатели группировались по изменению экспрессии по отношению к контрольному гену, как активирующиеся (>1) и ингибирующиеся (<1) под воздействием ионизирующего излучения в исследуемых группах.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ STATISTICA 7.0 и включала в себя определение медианы и 25 и 75 % квартилей. Для оценки значимости различий применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Значения медианы в группе «биоконтроль» были приняты за единицу, а значения медианы в исследуемых группах показывали, во сколько раз уровень экспрессии показателя выше или ниже по отношению к контролю

ной группе. Различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$, где p – показатель статистической значимости данных.

Результаты

Рост опухоли наблюдали в обеих группах мышей, однако скорость роста в группе, облученной в малой дозе (кривая 2), была ниже, чем в аналогичной группе без облучения (кривая 1) (рис. 1).

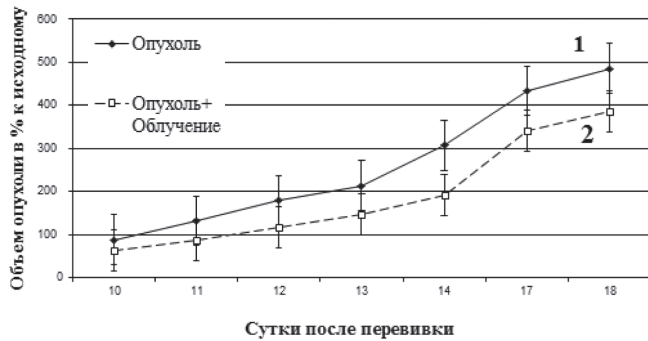


Рис.1. Изменения объема перевиваемой опухоли у мышей (1) без воздействия излучения в малой дозе («Опухоль») и (2) с облучением в МДР («Опухоль+облучение»)

Fig.1. Changes in the volume of the transplanted tumor in mice (1) without LDR («Tumor») and (2) with LDR («Tumor + irradiation»)

Профиль изученных генов и некодирующих РНК показал, что в группе «опухоль» отмечается преобладание в активации онкогенов во всех исследуемых органах мышей (64, 57 и 57 % соответственно в костном мозге, селезенке и тимусе) (рис. 2). Экспрессия некоторых показателей оставалась неизменной (поэтому суммарное количество онкогенов или онкосупрессоров в пределах одного органа не везде составляет 100 %).

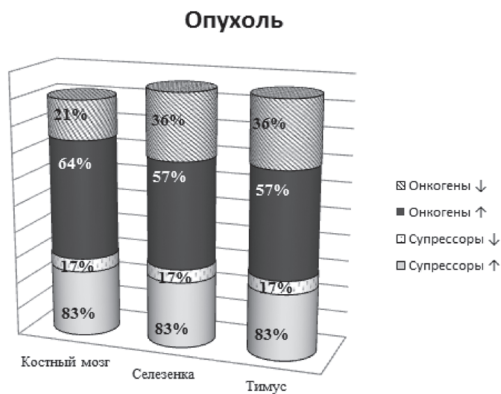


Рис.2. Процент активированных онкогенов и онкосупрессоров в тканях мышей в группе «Опухоль» без воздействия облучения

Fig.2. Percentage of activated oncogenes and oncosuppressors in the tissues of mice in the «Tumor» group without radiation exposure

В то же время в группе «Биоконтроль+облучение» отмечается преобладание в активации онкогенов в костном мозге (57 %) и клетках тимуса (86 %) (рис. 3А).

Иная ситуация отмечается в группе «Опухоль+облучение», где количество инактивированных онкогенов превышало количество активированных в процентном соотношении (71/50 в костном мозге, 64/36 в селезенке, 64/36 в тимусе и 57/36 в опухоли). Кроме того, отмечается увеличение экспрессии онкосупрессоров в

костном мозге (33 %), тимусе (83 %) и селезенке (67 %). В опухолевой ткани наблюдали активацию всех исследуемых онкосупрессоров (100 %) при воздействии ионизирующего излучения (рис. 3Б). Из полученных данных следует, что у мышей с инокулированной опухолью наиболее чувствительными органами к действию МДР по активации онкосупрессоров является тимус (83 %), а по ингибированию онкогенов – костный мозг (71 %).

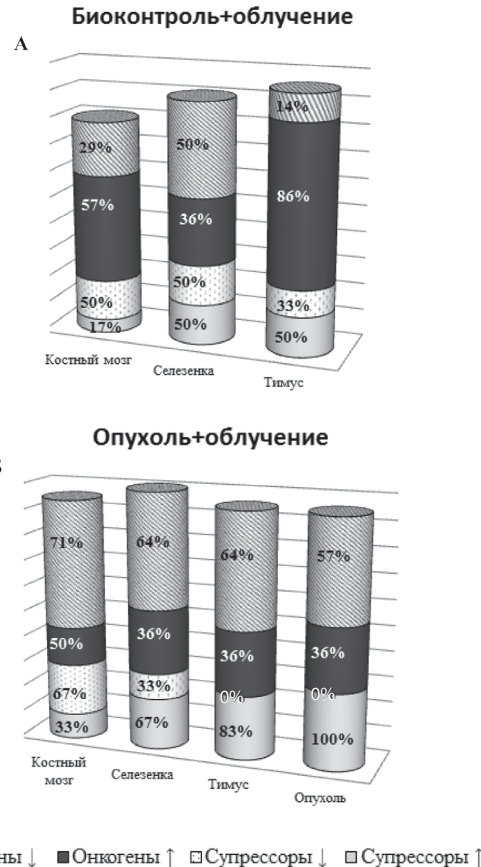


Рис.3. Процент онкогенов и онкосупрессоров активированных или ингибированных в тканях мышей в группе «Биоконтроль+облучение» (А) и «Опухоль+облучение» (Б)

Fig.3. Percentage of oncogenes and oncosuppressors activated or inhibited in mouse tissues in the group «Biocontrol+ irradiation» (А) and «Tumor+irradiation» (Б)

Таким образом, если в группе «Опухоль» активировались преимущественно онкогены, то в группе мышей «Опухоль+облучение» преобладало подавление активности онкогенов и активация экспрессии онкосупрессоров в тимусе и опухоли.

Обсуждение

Было показано, что МДР стимулируют врожденный и адаптивный иммунитет и репрограммируют опухолевую микросреду, активируя лимфатическую систему и, соответственно, выход Т-клеток, направленных на эрадикацию опухоли [6].

В клетках рака легкого линии А549 было выявлено, что облучение в МДР повышает экспрессию иммунных checkpoint-молекул CD47 и PD-L1, связанных с активностью JAK2/STAT3 пути. Применение комбинации ингибиторов CD47 и PD-L1 и излучения в малой дозе снижало уровень экспрессии checkpoint-молекул, а также блокировало JAK2/STAT3 патологический путь в тканях опухоли, что приводило к увеличению CD8+

T-лимфоцитов и значительно ингибировало опухолевый рост [7].

В эксперименте по облучению мышей в дозе 0,075 Гр было отмечено повышение чувствительности опухолевых клеток к высоким дозам радиации. Эту схему облучения авторы считают потенциально новым путем для радиотерапии, поскольку снижается радиорезистентность опухолевых клеток. Представленные данные показали, что реакция злокачественных клеток на комбинированное облучение связана с более быстрым и эффективным ответом в виде индукции гибели клеток и остановки клеточного цикла в стадии G1 [8].

Другими авторами было доказано, что облучение мышей в МДР индуцировало стабилизацию здоровых клеток к последующему облучению высокими дозами, которые применяются при радиотерапии [9].

В проведенном нами эксперименте показано, что облучение мышей в дозе 0,075 Гр с трансплантированной карциномой Льюиса приводило к замедлению роста опухоли, что сопровождалось активацией онкосупрессоров и ингибированием экспрессии онкогенов (рис. 3Б). В группе «опухоль» без облучения такой тенденции отмечено не было (рис. 2).

В то же время, рост опухоли у мышей, не подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения в малой дозе, был более интенсивным, что отражалось в увеличенном объеме опухоли у мышей (кривая 1) к 18 сут. от начала эксперимента (рис. 1). Эта закономерность сопровождалась повышенной активностью онкогенов, стимулирующих развитие злокачественных новообразований [10].

Полученные результаты показывают роль молекулярно-генетических структур (генов и некодирующих РНК) в реакциях, модулируемых ионизирующим излучением в малых дозах [11, 12]. Регуляция клеточного цикла связана с множеством важных биологических процессов, метаболических путей, ответов на стресс, ДНК-повреждений, репарации и множеством других функций.

Было продемонстрировано, что воздействие МДР блокирует переход нормальных клеток из G1-стадии с запуском механизмов синтеза ДНК для последующей клеточной пролиферации. Это обеспечивается активацией множества сигнальных путей. Тем самым МДР могут обеспечивать защиту нормальных клеток, что является одним из проявлений адаптивного ответа [13].

Благодаря сложной связи между повреждением ДНК и ответом контрольных точек клеточного цикла, под воздействием МДР формируется адаптивный ответ, что защищает нормальные клетки от повреждений. Для опухолевых клеток характерно лишь повышение радиочувствительности при действии МДР.

Дифференциальная регуляция механизмов клеточного цикла в ответ на действие МДР и высоких доз радиации может помочь в определении эффекта МДР. Индуцируемая регуляция клеточного цикла и изменение радиорезистентности стволовых клеток в ответ на действие МДР являются следующими перспективными направлениями, которые могут привести к достижениям в регенеративной медицине и тканевой инженерии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Sharma D.N., Guleria R., Wig N., Mohan A., Rath G., Subramani V., et al. Low-Dose Radiation Therapy for COVID-19 Pneumonia: a Pilot Study. *Br. J. Radiol.* 2021;94:1126:20210187. DOI: 10.1259/bjr.20210187.
- Cezyriat K., Tournier B.B., Millet P., Dipasquale G., Koutsouvelis N., Frisoni G.B., et al. Low-Dose Radiation Therapy Reduces Amyloid Load in Young 3xTg-AD Mice. *J. Alzheimers Dis.* 2022;86:2:641-653. DOI: 10.3233/JAD-215510.
- Lumniczky K., Impens N., Armengol G., Candéias S., Georgakilas A.G., Hornhardt S., et al. Low Dose Ionizing Radiation Effects on the Immune System. *Environ. Int.* 2021;149:106212. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106212.
- Dahl H., Eide D.M., Tengs T., Duale N., Kamstra J.H., Oughton D.H. et al. Perturbed Transcriptional Profiles after Chronic Low Dose Rate Radiation in Mice. *PLoS One.* 2021;16:8:e0256667. DOI: 10.1371/journal.pone.0256667. eCollection 2021.
- Михайлов В.Ф., Салеева Д.В., Рождественский Л.М. и др. Активность генов и некодирующих РНК как подход к определению ранних биомаркеров радиондуцированного опухолеобразования у мышей // *Генетика*. 2021. Т. 57, № 10, С. 1131-1140. DOI: 10.31857/S0016675821100076. [Mikhaylov V.F., Saleyeva D.V., Rozhdestvenskiy L.M., et al. Activity of Genes and Non-Coding RNA as an Approach to Early Biomarkers Determination of Radiation-Induced Cancer in Mice. *Genetika = Russian Journal of Genetics*. 2021;57:10:1131-1140. DOI: 10.31857/S0016675821100076. (In Russ.)].
- Herrera F.G., Romero P., Coukos G. Lighting up the Tumor Fire with Low-Dose Irradiation. *Trends Immunol.* 2022;43:3:173-179. DOI: 10.1016/j.it.2022.01.006.
- Wan X., Fang M., Chen T., Wang H., Zhou Q., Wei Y., et al. The Mechanism of Low-Dose Radiation-Induced Upregulation of Immune Checkpoint Molecule Expression in Lung Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022;608:102-107. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.03.158.
- López-Nieva P., González-Vasconcellos I., González-Sánchez L., Cobos-Fernández M.A., Ruiz-García S., Pérez R.S., et al. Differential Molecular Response in Mice and Human Thymocytes Exposed to a Combined-Dose Radiation Regime. *Scientific Reports.* 2022;12:3144. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07166-8>.
- Zhou L., Zhang X., Li H., Niu C., Yu D., Yang G., et al. Validating the Pivotal Role of the Immune System in Low-Dose Radiation-Induced Tumor Inhibition in Lewis Lung Cancer-Bearing Mice. *Cancer Med.* 2018;7:4:1338-1348. DOI: 10.1002/cam4.1344.
- Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:18:9667. DOI: 10.3390/ijms22189667.
- Qi Z., Guo S., Li C., Wang Q., Li Y., Wang Z. Integrative Analysis for the Roles of lncRNAs in the Immune Responses of Mouse PBMC Exposed to Low-Dose Ionizing Radiation. *Dose-Response.* 2020;18:1:1559325820913800. DOI: 10.1002/cam4.1344.
- Khan M.G.M., Wang Y. Advances in the Current Understanding of How Low-Dose Radiation Affects the Cell Cycle. *Cells.* 2022;11:3:356. DOI: 10.3390/cells11030356.
- Rusin M., Ghobrial N., Takacs E., Willey J.S., Dean D. Changes in Ionizing Radiation Dose Rate Affect Cell Cycle Progression in Adipose Derived Stem Cells. *PLoS One.* 2021;16:4:e0250160. DOI: 10.1371/journal.pone.0250160.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Работа выполнена по теме ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна «Технология-2» (госзадание №10.009.20.800) и по теме Института общей генетики им Н.И. Вавилова РАН (госзадание №0112-2019-0002).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.09.2022. **Принята к публикации:** 25.11.2022.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out on the topic of the A.I. Burnazyan State Scientific Research Center «Technology-2» (state task No. 10.009.20.800) and on the topic of the N.I. Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences (state task No. 0112-2019-0002).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.09.2022. **Accepted for publication:** 25.11.2022.