12. Заболотских И. Б., Синьков С. В., Шапошников С. А. Диагностика и коррекция расстройств системы гемостаза. -М.: Практическая медицина, 2008. – 331 с.

13. Киреев И. А., Музыченко В. П., Заболотских И. Б., Григорьев С. В. Организация анестезиологической помощи в акушерстве: нормативно-правовая документация Американского общества анестезиологов // Анестезиология и реаниматология. – 2010. – № 6. – С. 64–68.

14. Ланцев Е. А., Абрамченко В. В. Анестезия, интенсивная терапия и реанимация в акушерстве. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 623 с.

15. Макацария А. Д., Бицадзе О. В. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике. - М.: «Триада-Х», 2003. – 903 с.

16. Макацария А. Д., Бицадзе О. В., Акиньшина С. В. Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике. -М.: Медицинское информационное агентство, 2007. – 1064 с.

17. Морган Дж. Эдвард, Мэгид С. Михаил. Клиническая анестезиология, том 3. - М.: БИНОМ, 2006. - 296 с.

18. Музыченко В. П., Прохорова И. Н., Синьков С. В., Магомедов М. А. Динамика состояния системы гемостаза у беременных с преэклампсией при родоразрешении в условиях общей анестезии// Вестник РУДН. Серия «Медицина». - 2013. - № 3. - С. 60-67.

19. Музыченко В. П., Тимохова С. Ю., Капущенко И. Н. и соавт. Структура нарушений гемостаза у беременных с гестозом // Куб. науч. мед. вестник. - 2011. - № 5 (128). -C. 99-102.

20. Музыченко В. П., Тимохова С. Ю., Прохорова И. Н., Синьков С. В., Заболотских И. Б. Динамика состояния системы гемостаза у беременных с преэклампсией при родоразрешении в условиях регионарной анестезии // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 1. – С. 128–133.

21. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 25 ноября 2002 г. № 363 «Об утверждении инструкции по применению компонентов крови».

22. Синьков С. В., Заболотских И. Б., Пенжоян Г. А., Музыченко В. П. Тромбофилии и принципы тромбопрофилактики в акушерстве // Анестезиология и реаниматология. - 2011. -№ 2. – C. 66–70.

23. Синьков С. В., Заболотских И. Б., Шапошников С. А. Приобретенные коагулопатии: современные подходы к дифференциальной диагностике и интенсивной терапии с позиций доказательной медицины // Обшая реаниматология. – 2007. – T. III. № 5–6. – C. 192–198.

24. Шифман Е. М. Преэклампсия, эклампсия, HELLP-синдром. – Петрозаводск: «ИнтелТек», 2002. – 432 с.

25. Шифман Е. М., Тиканадзе А. Д., Вартанов В. Я. Инфузионно-трансфузионная терапия в акушерстве. - Петрозаводск: «ИнтелТек», 2001. - 304 с.

26. Шулутко Е. М., Васильев С. А., Буланов А. Ю. Гемодилюция и гемодилюционная коагулопатия // Терапевтический архив. – 2006. – № 7. – С. 90–94.

27. Alexander J. M., Lucas M. J., Ramin S. M. et al. The course of labor withand without epidural analgesia // Am. j. obstet. gynecol. - 1998. - V. 178 (3). - P. 516-520.

28. Bernstein I. M., Ziegler W., Badger G. J. Plasma volume expansion in early pregnancy // Obstet gynecol. - 2001. - V. 97. -P. 72-76.

29. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy // Thromb res. - 2004. - V. 114. - P. 409-414.

30. David H. Chestnut et al. Obstetric anesthesia: principles and practice. 4ht ed. - 2009. - 1222 p.

31. Sinkov S. V., Zabolotskikh I. B., Shaposhnikov S. A. The role of instrumental diagnostic techniques in the assessment of the degree of hemostatic dysfunction // Journal of thrombosis and hemostasis. - 2009. - Vol. 7. Suppl. 2. -P. 251.

Поступила 05.09.2014

А. В. ПОПОВА¹, М. Л. ЛИМ², Е. А. ГУБАРЕВА', А. Х. КАДЕ'

ФИБРОБЛАСТЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА: ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ IN VITRO ПОСЛЕ ГАММА ОБЛУЧЕНИЯ

¹Кафедра общей и клинической патофизиологии; Международный научно-исследовательский клинико-образовательный центр регенеративной медицины ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 350063, г. Краснодар, ул. Седина, 4;

²Передовой центр трансляционной регенеративной медицины Каролинского института, Швеция, SE-14186, г. Стокгольм, Huddinge KFC/Novum, Halsovagen 7, hiss A, plan 6, exp. 615; тел. + 7 960 4775747. E-mail: popova.alina.88@gmail.com

Несмотря на широкий спектр фундаментальных исследований в области радиотерапии, в настоящее время остается открытым вопрос оптимизации терапевтических доз гамма-облучения. Исследование фибробластов кожи человека в модели in vitro направлено на поиск дозы радиации, которая, сохраняя лечебный эффект, в минимальной степени наносила вред здоровым клеткам. Кроме того, в работе определен промежуток времени, необходимый для выявления процессов клеточного повреждения и восстановления клетки после радиационного УДК 577 (075.8)

стресса. Установлено, что 24–48 часов после гамма-облучения (2, 4, 12 Гр) достаточно для обнаружения влияния разных доз радиации на жизнедеятельность фибробластов. 2 Гр является безопасной для клеток дермы дозой радиотерапии. Следовательно, можно предположить, что в клинических условиях риск возникновения долгосрочных осложнений (например, фиброза) после такого облучения меньший, чем в дозе 4–12 Гр. Для определения сроков восстановления клеток, поврежденных гамма-радиацией более 2 Гр, требуется большее время.

Ключевые слова: гамма-облучение, фибробласты, пролиферация, жизнеспособность клеток.

A. V. POPOVA¹, M. L. LIM², E. A. GUBAREVA¹, A. H. KADE¹

GAMMA IRRADIATED HUMAN FIBROBLASTS: VIABILITY AND PROLIFERATION ACTIVITY IN VITRO

¹Basic and clinical physiopathology department; international research, clinical and educational center of regenerative medicine SBEI HPL «Kuban state medical university» of the Ministry of health care of the Russian Federation.

Russia, 350063, Krasnodar, Sedina str., 4;

²the advanced Center for translational regenerative medicine (ACTREM)

Karolinska Institutet,

KFC/Novum, Halsovagen 7, hiss A, plan 6, exp. 615, SE-14186 Huddinge, Stockholm, Sweden; tel. + 7 960 4775747. E-mail: popova.alina.88@gmail.com

Despite the wide range of basic research in the field of radiotherapy, certain aspects of therapeutic gamma radiation doses remain unknown. The present in vitro investigation of irradiated human skin fibroblasts is aimed at finding radioactive dosage, which would maintain anti-tumours effect without inflicting damage to healthy cells. Furthermore, the authors observe the timing required for cell damage detection as well as the recovery after the radiation stress. Thus, it was shown, that 24–48 hours after gamma irradiation at 2, 4, 12 Gy is a period of time sufficient to identify the dose affecting fibroblast vital functions. It was additionally found that radiation of 2 Gy has no effect on viability and proliferation capacity of dermis cells. Consequently, we can assume that clinical risks of long-term complications (e. g., fibrosis) after such radioactive exposure is lower than after the 4–12 Gy radiation impact. Moreover, the 48 hour period is not enough to identify reparation time required by the cells which have been gamma irradiated by more than 2 Gy.

Key words: gamma radiation, fibroblasts, proliferation, cellular viability.

Введение

Радиотерапия, в частности гамма-облучение, на сегодняшний день является одним из самых эффективных лечебных подходов мирового масштаба. Целью лучевой терапии являются стимуляция механизмов репарации ДНК, блокирования клеточного цикла и/или уничтожение клеток, формирующих патологический очаг, например, злокачественную опухоль [4]. Тем не менее в результате облучения неминуемо повреждается окружение опухоли здоровые ткани. В месте воздействия гамма-лучей на все слои кожи возможно формирование лучевых ожогов (ранние лучевые реакции), мелкоочаговых кровоизлияний, повышение ломкости сосудов, а также таких поздних лучевых осложнений, как фиброз или нарушение процессов заживления ран [1, 3, 6, 10]. Следовательно, в радиотерапевтической практике считается крайне важным использовать гамма-облучение в тех дозах, которые не наносят непоправимого вреда пациентам и не препятствуют репаративному функционированию «эффекта свидетеля» [1, 3, 12]. Ряд авторов полагают, что малые дозы радиации оказывают исключительно положительный лечебный эффект, стимулируя клеточную пролиферацию, в частности фибробластов [2, 7]. Существует также мнение, что малые дозы облучения в случае нерепарируемых повреждений способны активировать апоптоз [11, 12]. В процессе реагирования клетки на радиоактивное облучение как малых, так и больших доз важную роль играет целый каскад факторов, включающий универсальные интрацеллюлярные механизмы, тип радиочувствительности и пролиферативный статус и др. [1-3, 11, 12]. Несмотря на большое количество исследований в данной области, в настоящее время сохраняются противоречия в вопросах оптимизации терапевтических доз гамма-облучения, а также времени, которое требуется клеткам для восстановления поврежденных тканей после радиационного стресса. Таким образом, целью настоящей работы является сравнительная оценка краткосрочного эффекта различных доз радиации на пролиферативную функцию и жизнеспособность клеток in vitro на примере изучения монослоя культуры гамма-облученных фибробластов кожи человека.

Материалы и методы Культура клеток

В настоящей работе мы исследовали линию фибробластов кожи человека (CRL-2429; ATCC).

После предварительной разморозки клетки культивировались до 10–16-го пассажа и вводились в эксперимент. Для поддержания жизнедеятельности фибробластов в условиях in vitro была использована специальная питательная среда Dulbecco в модификации по Iscove, обогащенная 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 1%-ной комбинацией пенициллина/стрептомицина (Invitrogen).

Культивирование, подготовка к облучению

Замена питательной среды в культуре фибробластов проводилась дважды в неделю. По достижении 80%-ной конфлюэнтности клетки подвергались очередному пассажу. Методика выглядела следующим образом. Клеточная культура однократно промывалась фосфатным буфером (DPBS) без кальция и магния (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium and magnesium). Открепление клеток достигалось путем их инкубации при +37° С в присутствии 5%-ной СО, совместно с раствором трипсина TrypLe Express (Invitrogen), который по истечении трех минут нейтрализовался добавлением питательной среды. Затем суспензия клеток центрифугировалась со скоростью 300 g. После осторожного удаления надосадочной жидкости осадок с клетками разбавлялся культуральной средой.

Гамма-облучение

Облучение клеточных суспензий производилось в 137 Сs радиоактивной установке «Gamma Cell 2000». Необходимая экспериментальная доза радиации достигалась путем однократной экспозиции клеток гамма-лучам в течение различных периодов времени: 2 Гр (35 секунд), 4 Гр (1 минута и 10 секунд), 12 Гр (2 минуты и 5 секунд). Непосредственно после процедуры облучения клетки помещались на культуральный пластик (BD) в единой для всех экспериментов плотности. Необлученные образцы (0 Гр) использовались в качестве негативного контроля во всех экспериментальных исследованиях, повторенных трехкратно.

Анализ жизнеспособности in vitro

Выживаемость фибробластов после облучения была исследована с помощью тест-системы «Live/Dead Viability/cytotoxicity test (Invitrogen)» через 24 часа, а также на пятый день после радиационного стресса. Процедура окрашивания проводилась в соответствии с инструкцией производителя. Так, облученные клеточные культуры вначале однократно промывались фосфатным буфером DPBS (Invitrogen) и окрашивались в течение 10 минут рабочим раствором, содержащим: 2.5 µM Calcein AM и 5 µM EthD-1, при комнатной температуре. Далее с помощью флуоресцентного микроскопа («Olympus IX70») на длине волны 515 нм выявлялись жизнеспособные клетки (зеленый цвет), а на 635 нм – мертвые (красный цвет). Благодаря зафиксированным изображениям клеточная жизнеспособность была проанализирована количественно, а полученные данные представлены графически.

Исследование метаболической активности

С целью косвенного подтверждения/опровержения наличия дозозависимого эффекта радиации (0-20 Гр) на пролиферативные свойства фибробластов мы изучили их метаболическую активность с помощью колориметрического MTTтеста (Roche). Кроме того, чтобы выявить способность клеток к восстановлению собственной метаболической функции за небольшой период времени, мы провели данную процедуру после гамма-облучения дважды с интервалом в 48 часов. Эксперимент состоял из следующих этапов. Непосредственно после облучения клетки культивировали в течение 48 или 96 часов в 96-луночных планшетах с плоским дном (BD) при +37° С в присутствии 5%-ной СО₂. Затем фибробласты инкубировали с 0,5 мг/мл МТТ-реагентом № 1 на протяжении четырех часов. Добавление МТТ-реагента № 2 предшествовало 12-часовой инкубации клеток в вышеупомянутых условиях. После чего абсорбция в экспериментальных образцах измерялась с помощью ELISA-читающего устройства -«SpectraMax 250» («Molecular Devices»). Полученные данные представлены в виде графиков и статистически проанализированы.

Преждевременное старение клетки

Для оценки возможности различных доз радиации (0-12 Гр) необратимо подавлять репродуктивную функцию фибробластов мы исследовали облученные культуры на наличие клеток, оставшихся навсегда в фазе G0 митотического цикла, а также определили их количественное соотношение с клетками делящимися. Так, спустя 48 часов после экспозиции гамма-лучам экспериментальные образцы окрашивались с помощью многокомпонентного набора «Senescence β-Galactosidase staining kit» («Cell Signaling») на предмет выявления активности внутриклеточного фермента β-галактозидазы, которая возможна исключительно в клетках, необратимо прекративших процесс деления (эффект преждевременного старения). Протокол процедуры основывался на инструкции производителя, был оптимизирован и впервые использовался авторами для настоящих исследований. После 15-минутной фиксации при комнатной температуре 1Х-фиксационным раствором культуры клеток промывали трижды буфером DPBS (Invitrogen). Следующий этап процедуры представлял собой 12-часовую инкубацию фибробластов с β-галакто-окрашивающим раствором в условиях

О, при 37° С и продолжался трехкратным промыванием в буфере DPBS. Затем клетки дополнительно окрашивались раствором Харриса (Histolab) в разведении 1:5. Данный процесс длился в течение трех минут при комнатной температуре, после чего образцы промывались шестикратно в буфере и помещались в 70%-ный глицерол (Sigma-Aldrich). Благодаря комбинированному окрашиванию и снимкам светлопольной микроскопии (микроскоп «Olympus IX70», Япония) в каждом экспериментальном образце стало возможным отчетливо визуализировать отдельные клетки с β-галактозидазной активностью (березово-синий цвет), а также общую совокупность клеток без нее (фиолетово-розовая окраска). Сравнительная характеристика способности фибробластов сохранять пролиферацию после различных доз гамма-облучения проводилась путем ручного подсчета В-галакто-позитивных и негативных по данному маркеру клеток на светлопольных снимках и представлена графически в виде индекса пролиферации, в процентах.

Иммуноцитохимия

С целью выявления зависимости фибробластов от воздействия гамма-радиации (0-12 Гр) обратимо изменять пролиферативную активность, мы провели иммуноцитохимическое окрашивание экспериментальных образцов с использованием поликлонального антитела кролика (Thermo Scientific, клон SP6) к ядерному белку Кі-67, характерного активной экспрессией в фазах G1-, S-, М-, G2 клеточного цикла. На основе стандартного иммуноцитохимического подхода авторами был создан собственный протокол подготовки клеточных препаратов и впервые применен в настоящей работе. Так, 48 часов после гамма-облучения культуры фибробластов фиксировали в течение десяти минут 4%-ным раствором формальдегида (Histolab), промывали трижды в буфере DPBS и затем высушивали на воздухе. Далее в течение одного часа инактивировали эндогенную пероксидазу в буферном растворе, содержащем 5% козьей сыворотки (Cell Signaling) и 0,3% тритона X (Sigma-Aldrich), после чего препараты промывали в трех сменах раствора 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Очередным этапом процедуры была 12-часовая инкубация клеточных образцов с Кі-67 антителом (разведение 1:200) при +4° С. По завершении мечения первичным антителом препараты проводили в трех сменах раствора 0,1% Tween 20 по 5 минут и наносили антитело AlexaFluor 488 (Invitrogen), направленное против кроличьих антител. Инкубация образцов в присутствии вторичного антитела, разведенного в отношении 1:500, продолжалась в течение двух часов при комнатной температуре и предшествовала отмывке в трех сменах раствора 0,1% Tween 20. В качестве контрольного мечения клеточных ядер для визуализации ДНК использовали 4'.6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich). После 24-часовой инкубации в условиях +4° С каждый полученный образец исследовали с применением инвертированного микроскопа («Olympus IX70»), данные фиксировали как минимум тремя снимками цифровой фотокамерой при одинаковой интенсивности проходящего света и настройке конденсора. Полученный видеоархив использовали для количественной оценки экспрессии обученными клетками ядерного маркера пролиферации. Таким образом, уровень активности деления фибробластов после гамма-облучения был представлен на графике в виде индекса пролиферации, выражен в процентах. Во всех образцах негативного контроля, мечения которых первичным антителом заведомо не проводили, неспецифического связывания не обнаружили.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ «Graph Pad Prism» («Graph Pad Software»).

Результаты и обсуждение

Известно, что ионизирующая радиация обладает способностью сокращать продолжительность жизни у многих исследованных видов клеток за счет стимуляции механизмов преждевременного клеточного старения. Существуют свидетельства схожести морфологических изменений облученных фибробластов человека с признаками естественного старения клеток [11]. Как для облученной, так и для стареющей клетки характерен блок в G1/S фазе клеточного цикла, что необходимо для обеспечения дополнительного времени на репарацию перед удвоением ДНК в фазе S, а также перераспределения в клетке ресурсов между процессами роста, размножения и самоподдержания. Следовательно, когда вызванные радиацией повреждения генетического аппарата невозможно исправить, значительно снижается уровень пролиферативной активности и в конечном счете следует клеточная гибель по механизму некроза или апоптоза. Таким образом, радиочувствительность зависит от способности клетки противостоять пагубному влиянию облучения [8, 12]. Кроме того, зависимость эффекта радиации от дозы, воздействующей на покровные ткани, представляется в литературе следующим образом. Когда кожа во всей толще подвергается облучению в дозе 5-7 Гр, первичное поражение проявляется формированием эритемы, в диапазоне доз 8-15 Гр - шелушением, а при 15-25 Гр - влажным шелушением [1]. Радиоактивное повреждение эпидермиса в дозах, не превышающих 15-16 Гр, зависит скорее от кинетики его клеточной популяции, а не от конкретной радиоактивной дозы. В механизмах развития ранних лучевых

поражений кожи большое значение имеет блок процесса деления прогениторных клеток, что вызывает торможение самообновления кожного покрова. При дозах облучения 15-25 Гр длительность такого блокирования в клетках-предшественницах достигает 10–15 суток, и, как следствие, по мере того как число стволовых клеток уменьшается, эпидермис отслаивается и оголяется дерма, а ее поражение радиоактивными лучами носит дозозависимый характер. Несмотря на все вышеизложенное, не полностью освещенным остается вопрос радиочувствительности основных строительных компонентов дермы – фибробластов. Данные клетки не только продуцируют внеклеточный матрикс соединительной ткани, но и являются одними из ключевых участников заживления ран. Их необратимое повреждение может повлечь за собой отдаленные осложнения [1, 3].

В работе нашей задачей было оценить эффект однократного воздействия гамма-лучей на жизнеспособность и пролиферативные свойства фибробластов дермы in vitro, имитируя тем самым дневную фракцию суммарной дозы облучения, применяемого в дистанционной радиотерапии. В клинических условиях в зависимости от гистолого-анатомических особенностей злокачественной опухоли, ее размеров, состояния здоровья и возраста пациента, сопутствующей патологии, схемы и вида лучевой терапии, а также ряда других факторов такая разовая доза составляет около 2-12 Гр [3, 12]. Более того, при моделировании радиотерапевтической процедуры, мы учитывали условия ее пространственной организации и количество лучей, направленных на патологический очаг. Например, представим, что ежедневная фракция гамма-радиации в дозе 6-12 Гр одномоментно доставляется к месту локализации опухоли посредством облучения трех полей (тремя лучами). В таком случае большинство окружающих клеток получает радиационную нагрузку в объеме 2-4 Гр. Тем не менее нельзя обойти вниманием возможное увеличение этой дозы до максимального значения (12 Гр). Это может быть связано с разнообразием вариантов взаимного расположения здоровых клеток и хода лучей либо непосредственной близостью неизмененных клеток к злокачественному новообразованию. Так, для настоящего исследования были выбраны следующие экспериментальные дозы гамма-облучения: 0, 2, 4 и 12 Гр. Кроме того, мы посчитали необходимым определить временной интервал, достаточный для активации фибробластами собственных репаративных механизмов, а также для выявления максимального количества нежизнеспособных клеток в культуре после гамма-облучения в указанных дозах. Учитывая скудность информации в литературе по этому вопросу, при выборе временных точек для проведения экспериментов мы основывались на данных схожих исследований кроветворной ткани. Например, количество поломок в генетическом аппарате клеток костного мозга и крови через 24–48 часов после облучения составляло 100% при дозе 5 Гр, а через 5–6 дней клетки теряли жизнеспособность [1, 12]. Таким образом, мы сравнили краткосрочный эффект различных доз радиации на пролиферативную функцию и жизнеспособность фибробластов человека in vitro, стараясь максимально приблизить экспериментальные условия к клинике.

Дозозависимые эффекты гамма-облучения на фибробласты

Качественная оценка жизнеспособности дермальных фибробластов проводилась через 24 часа и на 5-е сутки после облучения клеток гамма-радиацией в дозах 0, 2, 4 и 12 Гр. В обеих экспериментальных системах в облученных культурах мертвые клетки визуализировались одинаково в очевидном меньшинстве, сравнимым с контрольными образцами (рис. 1А – 3), а при количественном анализе не было выявлено статистически достоверного повышения уровня летально поврежденных клеток, независимо от дозы радиации (рис. 1И). Более того, сохраняя исходную морфологию, на протяжении 5-х суток после воздействия любых радиоактивных доз облученные клетки также не проявили изменений в адгезивных свойствах.

По результатам МТТ-теста, проведенного через 48 и 96 часов после радиоактивного воздействия на фибробласты (рис. 2), уровень абсорбции формазана в клеточных образцах, облученных 2-4 Гр гамма-частиц, статистически достоверно (p > 0, 05) не отличался от контроля. Тем не менее 48 часов после облучения дозой 12 Гр в экспериментальных клетках существенно (р < 0, 01) снижался уровень формазановой абсорбции с его последующим повышением, отмеченным во время 96-часового анализа (p < 0, 001). Полученные результаты могут свидетельствовать об отсутствии влияния радиации в дозах 2-4 Гр на метаболизм фибробластов, а также об устойчивости клеток к низким и средним дозам облучения. В то же время под воздействием гамма-лучей в большей дозе (12 Гр) фибробласты демонстрируют краткосрочное (48 часов) снижение метаболической активности, а также тенденцию к ее восстановлению на 4-е сутки после радиационного стресса, но не достигающей уровня метаболической активности необлученных образцов (р < 0, 01).

Для подтверждения/опровержения факта сохранения фибробластами способности к делению после воздействия гамма-радиации была проведена оценка пролиферативной активности (Кi-67) и преждевременного старения (β-галактозидаза) в культуре клеток через 48 часов после



Рис. 2. Количественная оценка метаболической активности фибробластов после гамма-облучения в дозах 0, 2, 4 и 12 Гр (МТТ-тест). Длина волны спектрофотометра – 570 нм

Примечание: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001; **** – p < 0,0001. Гр – Грей; нм – нанометр.

облучения. Результаты иммуноцитохимического окрашивания с маркером Ki-67 (рис. 3Д – М), а также последующего количественного анализа (рис. 3Н) показали тенденцию снижения индекса пролиферации в образцах, облученных дозой более 2 Гр. Кроме того, были охарактеризованы клетки, находящиеся в состоянии преждевременного или биологического старения (рис. 3А – Г). Дозозависимой разницы в количестве стареющих клеток в культуре облученных фибробластов при сравнении с контролем (рис. 3Н) обнаружено не было (р > 0, 05). В настоящем исследовании мы не выявили пагубного влияния гамма-радиации в дозе 2 Гр на жизнеспособность фибробластов через 24 часа после облучения; в течение 48 часов также не изменялся уровень клеточного метаболизма и пролиферации, а количество стареющих клеток не превышало биологической нормы. Более того, на 4–5-е сутки после радиационного стресса клетки, оставаясь жизнеспособными, не теряли метаболической активности. Краткосрочное изучение фибробластов после гамма-облучения в дозе 4–12 Гр также не показало значительных измене-



учебных заведений. - Гомель: УО «ГГУ им. Ф. Скорины»,

2003. – 238 c.

Рис. 3. Качественная (А – М) и количественная (Н) оценки пролиферативной функции фибробластов через 48 часов после гамма-облучения в дозах

0 Гр (А, Д, И), 2 Гр (Б, Е, К), 4 Гр (В, Ж, Л) и 12 Гр (Г, З, М). На снимках светолопольной микроскопии

(А – Г) березовосиним цветом выделены клетки

с β-галактозидазной активностью. На снимках флуоресцентной микроскопии видны

ных DAPI (И – М); увеличение Х10. Гр – Грей;

β-Gal – маркер β-галактозидаза; DAPI-4, 6-diamidino - 2-phenylindole

ний жизнеспособности клеток, однако снижение пролиферативной функции было очевидным.

Таким образом, мы полагаем, что 24-48 часов после облучения являются периодом, достаточным для выявления доз гамма-радиации, способной повлиять на жизнедеятельность клеток в моделях in vitro. Тем не менее, на наш взгляд, требуется большее время, чтобы определить сроки восстановления клеток, поврежденных гамма-радиацией более 4 Гр.

На основании вышеизложенного, можно сделать предположение, что 2 Гр является безопасной для фибробластов дозой радиотерапии, а риск возникновения долгосрочных осложнений (например, фиброза) после облучения меньший, чем в дозе 4-12 Гр.

Настоящая работа была проведена при поддержке Гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования по договору от 19.10.2011 г. № 11.G34.31.0065.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доника А. Д., Поройский С. В. Учебно-методическое пособие «Основы радиобиологии» (предназначено для подготовки студентов медицинских и фармацевтических вузов специальностей, обучающихся по программе «Экстремальная и военная медицина. Организация медицинского обеспечения населения в чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера и в военное время»). - Волгоград, 2007. - 177 с.

2. Котеров А. Н. Малые дозы радиации: факты и мифы. Книга первая. Основные понятия и нестабильность генома. – М.: изд-во «ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России», 2010. – 283 c.

3. Храмченкова О. М. Основы радиобиологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей высших

4. An Y. S. et al. Substance P stimulates the recovery of bone marrow after the irradiation // J. cel. physiol. - 2011. - № 226. -P. 1204-1213.

5. Autsavapromporn N. et al. Human cell responses to ionizing radiation are differentially affected by the expressed connexins // J. radiat. res. - 2013. - № 54. - P. 251-259.

6. Gurung A. et al. Beta-catenin is a mediator of the response of fibroblasts to irradiation // Am. j. pathol. - 2009. - Jan. № 174 (1). - P. 248-255. doi: 10. 2353/ajpath. 2009. 080576. Epub 2008 Nov 26.

7. Kim C. S. et al. Low-dose of ionizing radiation enhances cell proliferation via transient ERK1/2 and p38 activation in normal human lung fibroblasts // J. radiat. res. - 2007. - Sep. № 48 (5). – P. 407–415.

8. Nicolay N. H. et al. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation // Int. j. radiat. oncol. biol. phys. - 2013. - Dec 1. № 87 (5). – P. 1171–1178. doi: 10. 1016/j. ijrobp. 2013. 09. 003.

9. Oliver L. et al. Differentiation-related response to DNA breaks in human mesenchymal stem cells // Stem. cells. -2013. - Apr. № 31 (4). - P. 800-807. doi: 10. 1002/stem. 1336.

10. Rødningen O. K. et al. Radiation-induced gene expression in human subcutaneous fibroblasts is predictive of radiationinduced fibrosis // Radiother. oncol. - 2008. - Mar. № 86 (3). -P. 314-320.

11. Vaziri H., Benchimol S. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss / DNA damage model of cell aging // Exp. gerontol. -1996. – Jan.-Apr. № 31 (1–2). – P. 295–301.

12. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students. International Atomic energy agency. - Vienna, 2010. IAEA, VIENNA, 2010, IAEA-TCS-42, ISSN 1018-5518, c IAEA, 2010. Printed by the IAEA in Austria. March 2010.

101