

Малые дозы радиации активируют в мезенхимных стволовых клетках сигнальный путь, направленный на ингибирование апоптоза

А.А. Кальянов¹, М.С. Конькова¹, Л.В. Каменева¹, Е.М. Малиновская¹, М.С. Абрамова¹,
О.А. Долгих¹, Е.С. Ершова¹⁻³, Н.Н. Вейко¹, Н.К. Голубева², П.Е. Умрюхин^{1,2,4}, С.В. Костюк¹⁻³

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», г. Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»
Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия;

³Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФГБНУ
«Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», г. Москва, Россия;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина»,
г. Москва, Россия

Аннотация

Фрагменты внеклеточной ДНК (вкДНК) из погибших клеток, как мы показали ранее, могут являться фактором стресс-сигнализации при действии малых доз радиации, и антиапоптотический ответ в мезенхимных стволовых клетках (МСК) при действии малых доз радиации может развиваться посредством участия внеклеточного медиатора передачи сигнала между клетками – фрагментов окисленной вкДНК. Однако не исследованы сигнальные каскады, обеспечивающие эти эффекты.

Цель. Изучить влияние малых доз радиации и окисленных фрагментов вкДНК на активацию в МСК генов сигнальных каскадов, регулирующих ответ клеток на повреждение ДНК.

Материалы и методы. Мы исследовали влияние малых доз радиации (10 сГр) и фрагментов окисленной вкДНК (в концентрации 50 нг/мл) на активацию в МСК генов сигнальных каскадов, регулирующих ответ клеток на повреждение ДНК.

Результаты. Показано, что в МСК при действии малых доз радиации через 15–40 мин активируется транскрипционная активность проапоптотических генов, возрастает уровень апоптоза и в результате гибели части клеток популяции в среде культивирования МСК образуются фрагменты окисленной внеклеточной ДНК. Через 3–72 ч уровень экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*, *BAK1*, *MMP7*, *ENDOG* снижается в 1,5–3 раза ($p < 0,01$), что сопровождается повышением уровня экспрессии антиапоптотических генов *BCL2*, *BCL2A1* (*Bfl-1/A1*), *BCL2L1* (*BCL-X*), *BIRC2* (*c-IAP1*) в 2–4 раза ($p < 0,001$) и, как следствие, снижением уровня апоптоза. Поскольку наблюдается одинаковая регуляция экспрессии генов МСК в ответ на облучение и при действии окисленных фрагментов вкДНК, одним из факторов стресс-сигнализации при действии малых доз радиации могут являться фрагменты вкДНК погибших клеток.

Заключение. Показано, что малые дозы радиации и окисленная вкДНК активируют сигнальный путь, регулирующий ответ на повреждение ДНК, что приводит к антиапоптотическому ответу в МСК.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, малые дозы ионизирующего излучения, апоптоз.

Рубрики MeSH:

СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ МЕЗЕНХИМНЫЕ - ВОЗДЕЙСТВИЕ ОБЛУЧЕНИЯ

Для цитирования: Кальянов А.А., Конькова М.С., Каменева Л.В. и др. Малые дозы радиации активируют в мезенхимных стволовых клетках сигнальный путь, направленный на ингибирование апоптоза. Сеченовский вестник. 2019; 10 (3): 4–12. DOI: 10.26442/22187332.2019.3.4-12

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Умрюхин Павел Евгеньевич, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; профессор кафедры нормальной физиологии, заведующий лабораторией «Здоровье и качество жизни студентов» ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); старший научный сотрудник лаборатории системных механизмов эмоций и эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина».

Адрес: ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, г. Москва, 119991, Россия

Телефон: +7 (926) 137-57-87

E-mail: pavelum@mail.ru

Статья поступила в редакцию: 21.03.2019

Статья принята к печати: 27.08.2019

Small doses of radiation activate a signaling pathway aimed at apoptosis inhibition in mesenchymal stem cells

Andrew A. Kaliyanov¹, Marina S. Konkova¹, Larisa V. Kameneva¹, Elena M. Malinovskaya¹, Margarita S. Abramova¹, Olga A. Dolgikh¹, Elizaveta S. Ershova¹⁻³, Natalia N. Veiko¹, Natalia K. Golubeva², Pavel E. Umriukhin^{1,2,4}, Svetlana V. Kostyuk¹⁻³

¹Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

³Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Centre of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia;

⁴Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

Abstract

We hypothesize that the anti-apoptotic response in mesenchymal stem cells (MSC) under low doses of radiation may develop through the participation of an extracellular mediator of signal transmission between cells – fragments of oxidized cell-free DNA (cfDNA).

Aim. To investigate the effect of radiation in low doses (10 sGy) and oxidized fragments of cfDNA on the activation of genes in MSCs signalling cascades that regulate the cellular response to DNA damage.

Materials and methods. We investigated the effect of radiation in low doses (10 cGy) and fragments of oxidized cfDNA (concentration 50 ng/ml) on the activation of signalling gene cascades in MSC that regulate the cellular response to DNA damage.

Results. We have shown, that in MSC under small doses of radiation for 15–40 minutes the transcriptional activity of proapoptotic genes is activated, the level of apoptosis increases and due to the death of part of the cells in the culture of MSC, fragments of oxidized cfDNA are formed. 3–72 hours later the expression of genes *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*, *BAK1*, *MMP7*, *ENDOG* decreases 1.5–3 times ($p < 0.01$), which is accompanied by an increase of the antiapoptotic genes expression: *BCL2*, *BCL2A1 (Bfl-1/A1)*, *BCL2L1 (BCL-X)*, *BIRC2 (c-IAP1)* by 2–4 times ($p < 0.001$), and, as a result, a decrease in the level of apoptosis. Since the regulation of gene expression in MSC in response to radiation and to the action of the oxidized cfDNA fragments is the same, we can assume that one of the factors of stress signalling in the action of radiation in low doses can be cfDNA fragments of dead cells.

Conclusion. Small doses of radiation and oxidized cfDNA may activate a signalling pathway in MSC, that regulates the response to DNA damage, leading to an antiapoptotic response.

Keywords: cell-free DNA, low doses of ionizing radiation, mesenchymal stem cells, apoptosis.

MeSH terms:

MESENCHYMAL STROMAL CELLS - RADIATION EFFECTS

For citation: Kaliyanov A.A., Konkova M.S., Kameneva L.V. et al. Small doses of radiation activate a signalling pathway aimed at apoptosis inhibition in mesenchymal stem cells. Sechenov Medical Journal. 2019; 10 (3): 4–12. DOI: 10.26442/22187332.2019.3.4-12

CONTACT INFORMATION:

Pavel E. Umriukhin, Doctor of Medical Science, Leading Researcher molecular biology laboratory, Research Center for Medical Genetics; Professor of Physiology Department, Head of the laboratory “Health and quality of life of students”, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Senior Researcher of the laboratory of system mechanisms of emotions and emotional stress in Anochin Institute of Normal Physiology.

Address: 8/2 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

Tel.: +7 (926)137-57-87

E-mail: pavelum@mail.ru

The article received: 21.03.2019

The article approved for publication: 27.08.2019

Список сокращений:

8-OHdG – 8-окси-дезоксигуанозин

вкДНК – внеклеточная ДНК

вкДНКокс_обл – внеклеточная ДНК, окисленная в результате облучения в дозе 10 сГр

Гр – Грей

МСК – мезенхимные стволовые клетки

сГр – санти Грей (10^{-2} Грей)

Воздействие высоких доз радиации ($>0,5$ Гр) отрицательно сказывается на здоровье человека, однако воздействие малых доз ионизирующего излучения изучено в меньшей степени. Люди могут контактировать с ионизирующим излучением при медицинском обследовании и терапии, при работе с источниками радиационного облучения. Расширение использования рентгенодиагностического оборудования, лучевой терапии, увеличение запасов ядерных отходов, строительство большого числа атомных электростанций сопровождаются повышенным вниманием к воздействию малых доз ионизирующего излучения на здоровье человека [1].

Несмотря на интенсивные исследования эффектов, вызываемых облучением в стволовых клетках, эффекты малых доз ионизирующего излучения на процессы в стволовых клетках остаются малоизученными, хотя многие исследования свидетельствуют о существенном влиянии малых доз радиации на функционирование клеток [1–3]. В то время как средние дозы ионизирующего излучения (1 Гр) приводят к индукции апоптоза в стволовых клетках, малые дозы 20–50 сГр не вызывают выявляемого изменения уровня апоптоза по сравнению с необлученным контролем [4, 5]. Стволовые клетки живут в организме человека в течение длительного времени, и это увеличивает вероятность того, что они могут накапливать генотоксические повреждения, полученные при действии внешних повреждающих факторов, в частности, ионизирующего излучения. После повреждения клетки могут восстановить целостность ДНК, но при обширных повреждениях ДНК клетки аккумулируют необратимые повреждения, что приводит к индукции апоптоза или к мутациям и злокачественной трансформации [6]. В связи с этим долгоживущие стволовые клетки могут быть основной мишенью для оценки воздействия малых доз радиации [6–8]. К сожалению, ключевые аспекты биологии стволовых клеток при действии малых доз ионизирующего излучения изучены слабо, что указывает на повышенную потребность в детальных исследованиях для лучшего понимания механизмов воздействия малых доз облучения на стволовые клетки [4]. Тем не менее из-за различных диапазонов доз, времени воздействия и популяций стволовых клеток, полученных из разных источников, общий вывод о влиянии малых доз радиации на стволовые клетки затруднен [4, 9, 10].

Нами было показано, что в результате облучения малыми дозами (10 сГр) в среде культивирования

мезенхимных стволовых клеток (МСК) *in vitro* при гибели части клеток появляются фрагменты внеклеточной ДНК. В результате окислительного стресса, сопровождающего действие малых доз радиации, фрагменты ДНК погибших клеток окисляются, проникают в цитоплазму живых клеток в популяции, индуцируют в клетках окислительный стресс и активируют в МСК сигнальный путь, в котором фрагменты внеклеточной ДНК (вкДНК) являются факторами стресс-сигнализации [11]. Этот сигнальный путь включает следующую последовательность событий в МСК: действие ионизирующего излучения на МСК → первичный окислительный стресс → окисление геномной ДНК МСК → апоптоз некоторого количества облученных клеток → освобождение окисленной вкДНК → синтез активных форм кислорода → окислительные модификации ДНК ядер клеток, образование быстро репарируемых разрывов ДНК ядер, кратковременный арест клеточного цикла → активация репарации ДНК и антиокислительного ответа в МСК → ингибирование апоптоза [11]. Таким образом, окисленные в результате действия радиации фрагменты вкДНК играют роль сигнальных молекул стресс-сигнализации в радиационно-индуцированном эффекте свидетеля – передают сигнал от облученных клеток к необлученным [11]. Однако не исследована последовательная активация генов сигнальных каскадов, регулирующих ответ на повреждение ДНК при действии малых доз радиации на стволовые клетки, что позволило бы объяснить ингибирование апоптоза в стволовых клетках при действии малых доз радиации.

Цель исследования: изучить влияние малых доз радиации (10 сГр) и окисленных фрагментов внеклеточной ДНК на активацию в МСК генов сигнальных каскадов, регулирующих ответ клеток на повреждение ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа одобрена на заседании комитета по биомедицинской этике ФГБНУ «МГНЦ» (протокол №6/3 от 15 ноября 2016 г).

Выделение и культивирование МСК

В исследовании использованы МСК из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». Клетки центрифугировали (200 g, 10 мин), переносили во флаконы и культивировали при 37°C в среде AmnioMax C-100 Basal Medium (Gibco, Thermo fisher scientific inc., США), содержащей AmnioMax C-100

Supplement, 20 мкмоль/л HEPES («ПанЭко», Москва) и антибиотики.

Исследование поверхностных маркеров МСК

Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител на приборе CyFlow (Partec GmbH, Германия).

Облучение МСК

МСК облучали в среде культивирования при 20°C с использованием импульсного рентгеновского излучения (Арина-3, ООО «Спектрофлэш», Россия). В качестве контроля использовались необлученные клетки. Культуры МСК облучали дозой 10 сГр.

Анализ уровня апоптоза МСК

Уровень апоптоза клеток оценивали на приборе CyFlow (Partec GmbH, Германия) с использованием стандартного метода — окраски клеток с применением аннексина V (FITC).

Выделение вкДНК

Выделение вкДНК из среды культивирования облученных клеток проводилось стандартным методом фенольной экстракции. Концентрацию вкДНК определяли с использованием красителя PicoGreen на спектрофлуориметре. Относительная стандартная ошибка метода измерения концентрации ДНК составляла не более 3%.

Определение уровня окислительной модификации вкДНК

Содержание во вкДНК маркера окисления: 8-окси-дезоксигуанозина (8-ОНдГ) определяли дот-иммуноблоттингом. Для этого пробы ДНК известной концентрации наносили на нитроцеллюлозный фильтр (Hybond Extra-C, Amersham, Великобритания), по 1,5 мкл в 3–5 повторах. После иммобилизации ДНК (30 мин при 80°C) фильтр смачивали PBS (натрий-фосфатный буфер, Phosphate buffered saline) и 30 мин инкубировали в блокирующем буфере (0,5% сухое обезжиренное молоко на PBS) при 37°C, затем 3 ч при комнатной температуре при покачивании в свежеприготовленном растворе анти-8-ОНдГ-антител (SC-66036, Santa Cruz Biotechnology, США) в подобранном разведении 15 мкл на 1 мл блокирующего буфера. Фильтр трижды по 5 мин отмывали буфером PBS-0,05% Tween 20 и инкубировали 1 ч в свежеприготовленном растворе конъюгата антитела к иммуноглобулинам мыши-щелочная фосфатаза (Sc-2008, Santa Cruz Biotechnology, США) в рекомендованном производителем разведении 1:1000 на PBS-0,05% Tween) при комнатной температуре при

покачивании. Затем фильтр дважды по 5 мин промывали PBS-0,05% Tween 20, однократно AP pH 9,5 (0,05М Трис pH 9,5, 0,2М NaCl), помещали в раствор субстрата для щелочной фосфатазы (BCIP/NBT) и инкубировали в темноте до проявления отчетливых сигналов. Интенсивность окрашенных пятен определяли компьютерным анализом изображения фильтра. В качестве стандартного образца для построения калибровочной зависимости, связывающей содержание окисленного основания 8-ОНдГ в составе исследуемой ДНК и сигнал иммуноблоттинга, использовали набор предварительно охарактеризованных масс-спектрометрически окисленных под воздействием ультрафиолета образцов ДНК.

Определение уровня экспрессии генов в МСК

Выделение РНК из лимфоцитов проводилось с использованием набора RNeasy Plus Mini Kit, Quagen, Германия, по протоколу производителя, концентрацию РНК определяли с помощью красителя Quant-iT RiboGreen RNA reagent («MoViТес», Германия), на планшетном ридере («EnSpire equipment», США). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью реактивов фирмы «Силекс» (Россия) согласно стандартной методике. Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием соответствующих праймеров («Синтол», Россия) и интеркалирующего красителя SybrGreen на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

Праймеры, использованные в работе (записаны в одинаковом порядке — F; R): TBP (референсный ген) (F: GCCCGAAACGCCGAATAT; R: CCGTGGTTCGTG-GCTCTCT), ING2 (F: CACAAATGCTCGAATTGGTGG; R: ACTTTCAGCAGGATCTTGGAAC), HUWE1 (F: TTG-GACCGCTTCGATGGAATA; R: TGAAGTTCAA-CACAGCCAAGAG), TP53 (F: TTTGGGTCTTTGAACC-CTTG; R: CCACAACAAAACACCAGTGC), BBC3 (F: GCCAGATTTGTGAGACAAGAGG; R: CAGGCACCTAATTGGGCTC), NOXA (F: ACCAAGCCGGATTTGC-GATT; R: ACTTGCACTGTTCCTCGTGG), P53AIP1 (F: CGGGGAATAGAAGCTCTGTCA; R: CTGGAGAGACCTAGACCAAGG), BCL2 (F: TTTGGAAATCCGACCACT-AA; R: AAAGAAATGCAAGTGAATGA), BAX (F: CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG; R: CCAGCCCATGATG-TTCTGAT), BAK1 (F: GTTTTCCGCAGCTACGTTTTT; R: GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC), MMP7 (F: CC-CACTGCGTTTTTCTCGAAT; R: CAAAGGGGTATC-CATCGCCAT), ENDOG (F: GCAGCTACCAAAACGTC-TATGT; R: CACSTTGAAGAAGTGTGTGGG), BCL2A1 (F: TACAGGCTGGCTCAGGACTAT; R: CGCAACATTTG-TAGCACTCTG), BCL2L1 (F: CGACGAGTTTGAACCTGCG-GTA; R: GGGATGTCAGGTCACTGAATG), BIRC2 (F: GAATCTGGTTTTCAGCTAGTCTGG; R: GGTGGGA-GATAATGAATGTGCAA). Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на приборе StepOnePlus («Applied Biosystems», США).

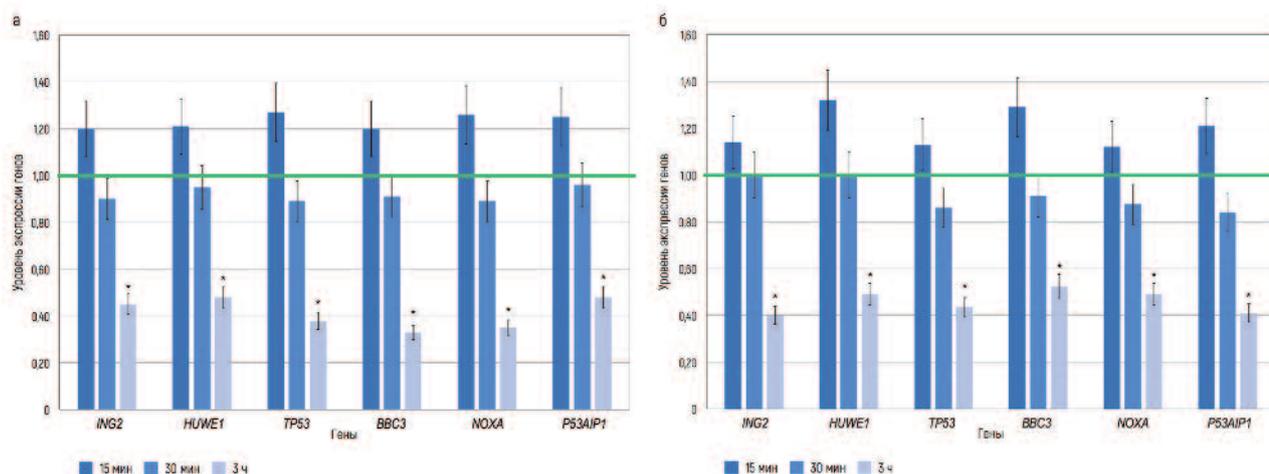


РИС. 1. Уровень экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1* в МСК, облученных – 10 сГр (а) и подвергнутых воздействию внеклеточной ДНК, окисленной в результате облучения в дозе 10 сГр, в концентрации 50 нг/мл (б) через 15, 30 мин и 3 ч после воздействия.

FIGURE 1. Level of *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1* genes expression in MSC, irradiated – 10 sGy (a) and exposed to oxidized with 10 sGy radiation cfDNA at a concentration of 50 ng/ml (b) in 15 min, 30 min and 3 hours after exposure.

Примечание. Зеленой линией обозначено нормированное значение – единица.

Note. The green line indicates the normalized level of expression – one.

* $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

* $p < 0.01$ compared with control.

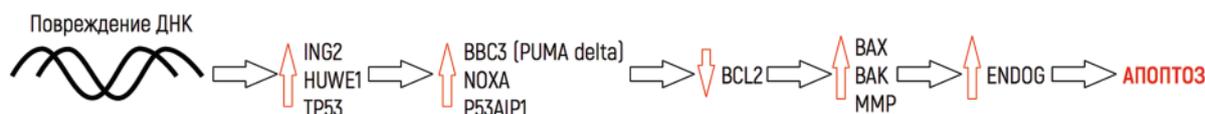


РИС. 2. Схематичное изображение сигнального каскада, состоящего из последовательного включения генов, регулирующих ответ на повреждение ДНК.

FIGURE 2. Schematic representation of the signaling cascade consisting of the sequential activation of the genes regulating the response to DNA damage.

Статистический анализ

Все результаты были воспроизведены по крайней мере три раза в ходе независимых экспериментов. Уровень экспрессии каждого гена посчитан относительно гена внутреннего стандарта *TBP* (TATA-binding protein).

Значимость наблюдаемых различий анализировалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U-тестов), значения $p < 0,01$ считались статистически значимыми. Данные анализировались с помощью профессионального программного обеспечения StatPlus 2007 (<http://www.analystsoft.com/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что на поверхности всех МСК присутствуют характерные для МСК молекулы I класса главного комплекса гистосовместимости HLA-ABC+, молекулы адгезии CD44+, CD54low, CD90+, CD106+, интегрины CD29+, CD49low, ростовой фактор CD105low. Маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45, HLA-DR, CD117, нехарактерные для МСК, отсутствовали.

Концентрация фрагментов собственной вкДНК в среде культивирования МСК в стандартных условиях в отсутствие дополнительных стрессирующих факторов оказалась в среднем 8 ± 2 нг/мл, что составляет 1,1% от всей ДНК ядер клеток.

На 4 разных культурах МСК через 30 мин после действия радиации в дозе 10 сГр уровень гибели клеток в популяции повышался, концентрация вкДНК возрастала в 2–3 раза ($p < 0,01$). Также по сравнению с интактными клетками увеличивался уровень маркера окисления вкДНК – 8-OHdG в 1,8–2,4 раза ($p < 0,01$).

Затем в серии параллельных экспериментов МСК облучали радиацией в дозе 10 сГр, отдельно в среду культивирования МСК добавляли образцы вкДНК, окисленной в результате облучения клеток в дозе 10 сГр (вкДНКокс_обл), в концентрации 50 нг/мл.

Мы показали, что уровень экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1* повышается на 15–26% только в первые 15 мин после воздействия малых доз радиации, так же, как и после добавления вкДНКокс_обл в концентрации 50 нг/мл к среде культивирования МСК (рис. 1).

Таблица. Изменение уровней экспрессии антиапоптотических и проапоптотических генов в МСК, облученных (10 сГр) и подвергнутых воздействию внеклеточной ДНК, окисленной в результате облучения в дозе 10 сГр, в концентрации 50 нг/мл, через 3 ч после воздействия,

Table. Changes in the antiapoptotic and proapoptotic genes expression in MSC, irradiated (10 sGy) and exposed to oxidized with 10 sGy radiation cfDNA at a concentration of 50 ng/ml, in 3 hours after exposure.

Гены	Воздействие	
	Радиация	вкДНКокс_обл
Антиапоптотические		
BCL2	4,0±0,4*	3,3±0,3*
BCL2A1 (Bfl-1/A1)	2,1±0,2*	2,4±0,2*
BCL2L1 (BCL-X)	2,1±0,3*	2,2±0,3*
BIRC2 (c-IAP1)	2,6±0,2*	2,5±0,2*
BIRC3 (c-IAP2)	2,5±0,2*	2,6±0,3*
Проапоптотические		
BAX	0,7±0,2*	0,6±0,3*
BAK1	0,5±0,3*	0,6±0,2*

* $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

* $p < 0.01$ compared with control.

Однако уже через 30–40 мин после действия радиации в дозе 10 сГр и вкДНКокс_обл в концентрации 50 нг/мл наблюдается снижение уровня экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1* до или ниже контрольных значений (интактных клеток, культивируемых в тех же условиях, без воздействия), см. рис. 1, а через 3 ч уровень экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*, *BAK1* снижается в 2–3 раза ($p < 0,01$), что сопровождается повышением уровня экспрессии антиапоптотических генов *BCL2*, *BCL2A1* (*Bfl-1/A1*), *BCL2L1* (*BCL-X*), *BIRC2* (*c-IAP1*) в 2–4 раза ($p < 0,01$), и, как следствие, снижением уровня апоптоза (см. рис. 1, см. таблицу).

Через 15 мин после воздействия вкДНКокс_обл или радиации в дозе 10 сГр количество клеток, взаимодействующих с аннексином V (FITC), увеличивалось в 2 раза, но через 2 ч снижалось по сравнению с контрольным уровнем (у необлученных клеток). Сниженный уровень апоптоза в МСК с ингибированием экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*, *BAK1* ($p < 0,01$) при действии малых доз радиации и вкДНКокс_обл сохранялся на протяжении 72 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ

Адаптивный ответ определяется как результат воздействия очень низкой дозы облучения, стимулирующей клеточные процессы, приводящий к повышению устойчивости ко второй большей дозе радиации, индуцирующей повреждение ДНК в клетках без предварительной обработки. Этот ответ включает активацию многочисленных сигнальных путей [12, 13]. Однако до сих пор ведутся споры о медиаторе передачи сигнала клеткам в популяции

при действии малых доз радиации. Мало известно о механизме развития адаптивного эффекта в клетках в результате действия малых доз радиации. Нами ранее показано, что адаптивный ответ в МСК при действии малых доз радиации может развиваться через внеклеточный медиатор передачи сигнала между клетками – фрагменты вкДНКокс_обл [11]. В настоящем исследовании в МСК определена экспрессия генов сигнальных путей, активирующихся в ответ на повреждение ДНК ядер клеток при действии радиации и вкДНКокс_обл.

Ранее мы установили, что радиация в дозе 10 сГр и вкДНК, образующаяся при гибели части стволовых клеток при облучении 10 сГр, вызывает сильный окислительный стресс в МСК, активируя синтез активных форм кислорода в МСК в течение первых 30 мин после радиационного воздействия, что приводит к окислительной модификации ДНК ядер клеток и образованию быстрорепарируемых двунитевых разрывов ядер МСК [11]. Наиболее значимым событием, сопровождающим действие малых доз радиации, является ингибирование апоптоза, которое наблюдается на протяжении 72 ч после действия радиации в дозе 10 сГр и вкДНКокс_обл в концентрации 50 нг/мл [11]. Однако не были исследованы сигнальные пути, регулирующие ответ на повреждение ДНК и апоптоз в МСК при действии малых доз радиации.

Известно, что в ответ на повреждение ДНК в клетках запускается сигнальный каскад, состоящий из последовательного включения генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, активирующих гены *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, что приводит к ингибированию гена *BCL2*, активации *BAX*, *BAK1* и в результате – к апоптозу клеток. Приводим схематично цепь последовательного включения генов (рис. 2).

Нами выявлены гены, последовательно активирующиеся в МСК при действии малых доз радиации, показано сходство в изменении транскрипционной активности генов, регулирующих ответ на повреждение ДНК при действии малых доз радиации и вкДНКокс_обл. В МСК при действии малых доз радиации, так же как при действии на клетки окисленных фрагментов вкДНК из среды культивирования клеток, через 15 мин активируются гены сигнального каскада, регулирующего ответ на повреждение ДНК. Но уже через 3 ч ингибируются гены *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, что приводит к индукции экспрессии гена *BCL2*, снижению уровня РНК генов *BAX*, *BAK1*, в результате активируются антиапоптотические процессы. Полученные данные подтверждают наше предположение о том, что активация генов, препятствующих апоптозу, может быть вызвана проникновением в клетки окисленных фрагментов внеклеточной ДНК. Ранее нами показано, что у лиц, длительно контактирующих с малыми дозами радиации, увеличен уровень окислительных модификаций ДНК ядер клеток в циркуляции, при этом в поврежденных клетках не активирован апоптоз [14]. Аналогичные изменения мы наблюдали при шизофрении, сопровождающейся высоким уровнем окислительного стресса [15]. Обнаруженная нами активация экспрессии генов сигнальных каскадов, регулирующих ответ на повреждение ДНК при действии малых доз радиации, может способствовать пониманию молекулярных механизмов активации антиапоптотических процессов при внешнем повреждающем воздействии (таком, как радиация) и при эндогенных процессах, сопряженных с генотоксическим воздействием (например, при шизофрении).

ВЫВОДЫ

Таким образом, мы показали, что и малые дозы радиации, и вкДНКокс_обл активируют сигнальный путь, регулирующий ответ на повреждение ДНК, что приводит к антиапоптотическому ответу в МСК. Сниженный уровень апоптоза в МСК при действии радиации в дозе 10 сГр и при действии окисленной вкДНК связан с ингибированием экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*,

BAK1, *MMP7*, *ENDOG* через 24–72 ч после действия малых доз радиации и окисленной вкДНК. Активация генов сигнального каскада, регулирующих ответ МСК на повреждение ДНК, может развиваться через внеклеточный медиатор передачи сигнала между клетками – фрагментами вкДНКокс_обл, поскольку наблюдали одинаковую регуляцию экспрессии генов МСК в ответ на облучение клеток радиацией в дозе 10 сГр и при действии вкДНКокс_обл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку МСК представляют собой пул резервных клеток для регенерации тканей, последствия действия малых доз радиации могут иметь решающее значение для МСК, так как разрывы ДНК ядер клеток могут приводить к перестройкам ДНК. В МСК при действии малых доз радиации, так же как при действии на клетки вкДНКокс_обл из среды культивирования клеток, образуются быстрорепарируемые двунитевые разрывы, а затем активируются антиапоптотические сигнальные пути, что связано с ингибированием экспрессии генов *ING2*, *HUWE1*, *TP53*, *BBC3*, *NOXA*, *P53AIP1*, *BAX*, *BAK1*. Снижение уровня апоптоза не всегда играет положительную роль, поскольку запрограммированная гибель клеток и морфологические проявления апоптоза необходимы для поддержания нормального клеточного гомеостаза и могут способствовать выживанию клеточных клонов с поврежденной ДНК.

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 17-29-06017 ofi-m, № 18-34-00878mol_a и в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Financial support. The study is supported by RFBR, project No. 17-29-06017 ofi-m, No. 18-34-00878mol_a and within the state task of the Ministry of education and science of Russia.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tang FR, Loke WK. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 2015; 91 (1): 13–27. DOI: 10.3109/09553002.2014.937510
2. Brenner DJ, Shuryak I, Einstein AJ. Impact of reduced patient life expectancy on potential cancer risks from radiological imaging. *Radiology* 2011; 261 (1): 193–8. DOI: 10.1148/radiol.11102452
3. Fabritius G, Brix G, Nekolla E et al. Cumulative radiation exposure from imaging procedures and associated lifetime cancer risk for patients with lymphoma. *Sci Rep* 2016; 17 (6): 35181. DOI: 10.1038/srep35181
4. Squillaro T, Galano G, De Rosa R et al. Concise Review: The effect of low-dose ionizing radiation on stem cell biology: a contribution to radiation risk. *Stem Cells* 2018; 36 (8): 1146–53. DOI: 10.1002/stem.2898
5. Sokolov M, Neumann R. Changes in gene expression as one of the key mechanisms involved in radiation-induced bystander effect. *Biomed Rep* 2018; 9 (2): 99–111. DOI: 10.3892/br.2018.1110
6. Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006; 441 (7097): 1080–6. DOI: 10.1038/nature04958
7. Alessio N, Del Gaudio S, Capasso S et al. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and im-

- paired the autophagy process. *Oncotarget* 2015; 6 (10): 8155–66. DOI: 10.18632/oncotarget.2692
8. *Prise KM, Saran A.* Concise review: Stem cell effects in radiation risk. *Stem Cells* 2011; 29 (9): 1315–21. DOI: 10.1002/stem.690
 9. *Bevelacqua JJ, Mortazavi SMJ.* Regarding "Concise Review: The Effect of Low-Dose Ionizing Radiation on Stem Cell Biology: A Contribution to Radiation Risk". *Stem Cells* 2018; 36 (11): 1789. DOI: 10.1002/stem.2898
 10. *Mortazavi S, Mozdarani H.* Non-linear phenomena in biological findings of the residents of high background radiation areas of Ramsar. *Int J Radiat Res* 2013; 11: 3.
 11. *Sergeeva VA, Ershova ES, Veiko NN et al.* Low-dose ionizing radiation affects mesenchymal stem cells via extracellular oxidized cell-free DNA: a possible mediator of bystander effect and adaptive response. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 9515809. DOI: 10.1155/2017/9515809
 12. *Coleman MA, Yin E, Peterson LE et al.* Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. *Radiat Res* 2005; 164 (4 Pt 1): 369–82. DOI: 10.1667/r3356.1
 13. *Bonner WM.* Low-dose radiation: Thresholds, bystander effects, and adaptive responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (9): 4973–5. DOI: 10.1073/pnas.1031538100
 14. *Korzeneva IB, Kostuyk SV, Ershova LS et al.* Human circulating plasma DNA significantly decreases while lymphocyte DNA damage increases under chronic occupational exposure to low-dose gamma-neutron and tritium b-radiation. *Mutat Res* 2015; 779: 1–15. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.05.004
 15. *Ershova ES, Jestkova EM, Chestkov IV et al.* Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients. *J Psychiatr Res* 2017; 87: 15–22. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2016.12.006

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Кальянов Андрей Александрович, аспирант ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7454-257X>

Конькова Марина Сергеевна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4734-7178>

Каменева Лариса Владимировна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8475-6435>

Малиновская Елена Михайловна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5046-3247>

Абрамова Маргарита Сергеевна, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0736-9949>

Долгих Ольга Адольфовна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4426-8864>

Ершова Елизавета Сергеевна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»; научный сотрудник лаборатории «Здоровье и качество жизни студентов» ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет); ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов критических состояний НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФГБНУ ФНКЦПР. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

Вейко Наталия Николаевна, д-р биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова». ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1847-0548>

Голубева Наталья Кимовна, канд. мед. наук, доцент кафедры нормальной физиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2633-6058>

Andrew A. Kaliyanov, Postgraduate Student, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7454-257X>

Marina S. Konkova, Ph.D. in Biol., Leading Researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4734-7178>

Larisa V. Kameneva, Researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8475-6435>

Elena M. Malinovskaya, Ph.D. in Biol., Leading Researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5046-3247>

Margarita S. Abramova, laboratory Researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0736-9949>

Olga A. Dolgikh, Researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4426-8864>

Elizaveta S. Ershova Ph.D. in Biol., Leading Researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Researcher of the laboratory "Health and quality of life of students", Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Leading Researcher, laboratory of molecular mechanisms of critical illness, Negovsky Research Institute of General Reanimatology of Federal Research and Clinical Centre of Intensive Care Medicine and Rehabilitology. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1206-5832>

Natalia N. Veiko, D.Sc. in Biol., chief researcher of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1847-0548>

Natalia K. Golubeva, Ph.D. in Med., Associate Professor of physiology Department, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2633-6058>

Умрюхин Павел Евгеньевич, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»; профессор кафедры нормальной физиологии, заведующий лабораторией «Здоровье и качество жизни студентов» ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет); старший научный сотрудник лаборатории системных механизмов эмоций и эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина». ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8628-7353>

Костюк Светлана Викторовна, д-р биол. наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова»; главный научный сотрудник лаборатории «Здоровье и качество жизни студентов» ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет); ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов критических состояний НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФГБНУ ФНКЦРР. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6336-9900>

Pavel E. Umriukhin, Doc. of Med. Sci, Leading Researcher molecular biology laboratory, Research Center for medical Genetics; Professor of Physiology Department, Head of the laboratory “Health and quality of life of students”, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Senior Researcher of the laboratory of system mechanisms of emotions and emotional stress, Anochin Institute of Normal Physiology. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8628-7353>

Svetlana V. Kostyuk, D.Sc. in Biol., Head of molecular biology laboratory, Research Centre for Medical Genetics; Chief Researcher of the laboratory “Health and quality of life of students”, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); leading researcher, laboratory of molecular mechanisms of critical illness, Negovsky Research Institute of General Reanimatology of Federal Research and Clinical Centre of Intensive Care Medicine and Rehabilitology. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6336-9900>