

# Влияние низких доз излучения иттербия-169 на пролиферацию и гибель клеток человека в культуре\*

Гильяно Н.Я., Коневега Л.В., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Носкин Л.А.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова.

В работе изучен эффект источников ионизирующего излучения на основе иттербия 169 на пролиферацию, прогрессию по циклу, апоптоз и уровень хромосомных aberrаций в клетках карциномы (линия HeLa G63) и эндотелиоцитах (линия ECV304) человека в культуре. Показано, что облучение клеток ИИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$ - (в диапазоне доз от 0,33–1,2 Гр) приводило к блокированию клеток в  $G_2/M$  фазах клеточного цикла. Блокирование прогрессии клеток зависело от дозы и носило необратимый характер, что приводило к репопуляционным изменениям и снижению концентрации клеток в образцах в различные временные интервалы после облучения. Ингибирование роста клеток  $^{169}\text{Yb}$  носило дозозависимый характер. Регистрация эффектов в отдаленные сроки после облучения  $^{169}\text{Yb}$  и сохранение их на протяжении нескольких клеточных генераций указывает на то, что под влиянием низких доз облучения происходит системное изменение метаболизма клетки. Включаются механизмы «чек-поинтного» (check point) контроля и апоптотической гибели клетки. Морфологический анализ клеток выявил индукцию апоптотической формы гибели не только и не столько в облученных клетках, сколько в их потомках, в которых регистрируются также и патологические митозы, нарушение митотического аппарата деления клеток. Некротическая форма гибели регистрировалась только после пролонгированного облучения клеток источниками  $^{169}\text{Yb}$ . Реализация эффекта облучения  $^{169}\text{Yb}$  в отдаленные сроки после облучения, предполагает возможность их модификации, что важно в клинической практике.

**Ключевые слова:** иттербий 169, клетки человека в культуре, хромосомные aberrации, клеточный цикл, апоптоз, проточная цитометрия

## Введение

В патогенезе интоксикационных воздействий на организм определяющим является поддержание баланса между процессами клеточного деления и гибелью клеток. Нарушение баланса вызывает или быстрый рост нежелательных и потенциально опасных клеток и/или потерю клеток, необходимых для сохранения функций тканей. И то и другое может приводить к опасным для жизни заболеваниям. К заболеваниям, ассоциированным с увеличением клеточного деления, относится рак, поэтому и радио-, и химиотерапия онкологических заболеваний — это, прежде всего, ингибирование деления клеток. Источники ионизирующего излучения (ИИИ) наряду с хирургией и химиотерапией широко применяются в онкологии. В последнее время все чаще используют контактную лучевую терапию (брахитерапию), при которой источник излучения вводится внутрь патологически измененного органа, в отличие от наружной лучевой терапии. Это позволяет облучать максимальными дозами непосредственно очаг опухоли при минимальном воздействии на окружающие здоровые ткани. В качестве источника излучения обычно используют радиоактивные изотопы  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{60}\text{Co}$ . В настоящее время в качестве перспективного радионуклида для брахитерапии рассматривается иттербий-169 ( $^{169}\text{Yb}$ ) [1]. Иттербий-169 благодаря своим ядерно-физическим свойствам (мягкий спектр  $\gamma$ -излучения, высокая удельная активность) является радионуклидом с большим потенциалом использования для брахитерапии опухолей. Его возможное применение в качестве клинического радионуклида рассматривается международной

фармацевтической компанией (Amersham International). К сожалению, источников  $^{169}\text{Yb}$  для брахитерапии в коммерческой доступности пока еще нет. Используемые нами источники  $^{169}\text{Yb}$ - были разработаны в ООО «Делиз» [2] в инновационном порядке.

Цель работы состояла в оценке эффективности летального и цитогенетического действия трех образцов  $^{169}\text{Yb}$ - на перевиваемых клеточных линиях человека. Эффективность действия источников ИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  проводили по ряду клинически приемлемых клеточных параметров, таких как: идентификация живых и умирающих клеток по изменению проницаемости клеточной мембраны; прогрессия клеток по клеточному циклу; изменение скорости роста клеток; индукция асимметричных хромосомных aberrаций и изменения морфологии клеток.

## Методика

Работа выполнена на культуре клеток человека: карциномы (линия HeLa-G63) и эндотелиоцитах (линия ECV 304). Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10% эмбриональной сыворотки. В качестве антибиотика использовали гентамицин. Облучение клеток проводили, помещая образцы  $^{169}\text{Yb}$  в эппендорфы с клетками в питательной среде. После облучения клетки рассеивали в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами. Клетки росли на поверхности покровного стекла и на поверхности флакона, что позволяло одновременно проводить морфологический и цитометрический анализ одной и той же популяции клеток. Для регистрации морфологи-

\* Авторы выражают благодарность зав. лаб. медицинской физики ФГБУ Институт ядерных исследований, д.ф.-м.н. Акулиничеву Сергею Всеволодовичу, генеральному директору ООО «Делиз», к.т.н. Держиеву Василию Ивановичу за предоставленные источники ИИ на основе иттербия-169 и их дозиметрические характеристики.

ческих изменений клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали этанолом, затем окрашивали ацетоорсеином и анализировали на световом микроскопе «Motic», снабжённом цифровой фотокамерой. На стёклах регистрировали клетки с морфологическими признаками, характерными для апоптоза, и хромосомные aberrации (мосты и фрагменты в анафазе). Клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена. Полученную клеточную суспензию центрифугировали, осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 0,1% бромистого этидия за 15 мин до анализа на проточном цитометре. Цитометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК проводили на проточном цитометре, созданном Степановым С.И. в лаборатории медицинской биофизики ПИЯФ [3]. Распределение клеток по содержанию ДНК позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2 с — G1; 3 с — S; 4 с — G2/M, так и оценить цитотоксичность препаратов, анализируя долю клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub-G1-популяцию), которые появляются в результате фрагментации ядра в процессе апоптотической гибели клеток [4]. Кроме того, цитометрический анализ позволяет оценить концентрацию клеток в образце. При посеве равной концентрации клеток и последующем анализе равного количества их и фиксированной скорости подачи клеток, различия в концентрации будут отображать репопуляционные изменения, индуцированные той или иной обработкой клеток. Анализ гистограмм (процентное соотношение клеток с различным содержанием ДНК к общему числу проанализированных клеток) проводили с помощью компьютерной программы, написанной Степановым С.И., которая является модифицированной формой программы [5]. В каждом случае анализировали от 10 до 20 тыс. клеток. Цитометрический анализ оценки жизнеспособности клеток по целостности клеточной мембраны проведены путем инкубирования их с флуоресцентным красителем пропидиум иодидом [6]. Клетки, выросшие на поверхности флакона, снимали раствором Версена. Проницаемость цитоплазматической мембраны используется как маркер жизнеспособных клеток, для этого используют флюорохромы, которые проникают только через по-

врежденные мембраны нежизнеспособных клеток. Они легко идентифицируются и визуально в микроскоп, и более ярко флюоресцируют при проточно-цитометрическом анализе.

Клеточную суспензию помещали на лед и затем добавляли раствор пропидиум иодида (конечная конц. 1 мкг/мл) и сразу анализировали на проточном цитометре.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены результаты оценки жизнеспособности клеток по целостности клеточной мембраны при инкубировании их с флуоресцентным красителем пропидиум иодидом сразу после облучения. Как видно из гистограмм, облучение клеток  $^{169}\text{Yb}$  в дозе 0,33Гр не меняло соотношения слабо флюоресцирующих клеток (1–20 канал) к ярко флюоресцирующим (100–1000 канал) клеток по сравнению с необлученным контролем. Спектры флюоресценции необлученных и облученных клеток полностью совпадают. Отсутствие эффекта излучения  $^{169}\text{Yb}$  на проницаемость клеточной мембраны (рис. 1А), возможно, связано с недостаточной высокой дозой и/или малым вкладом прямых радиационных повреждений в регистрируемый эффект. При облучении тех же клеток  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  в более высоких дозах (10 Гр) наглядно выявляется эффект облучения, а именно увеличивается доля ярко флюоресцирующих клеток, что свидетельствует об увеличении проницаемости клеточной мембраны (рис. 1Б). Очевидно, что при облучении клеток в высоких дозах  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  вклад прямых поражений (клеточных мембран/ молекул ДНК) больше, чем при облучении  $^{169}\text{Yb}$ . Нарушение клеточной пролиферации, индуцированное облучением источниками ИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  регистрировали по распределению клеток по содержанию ДНК при окрашивании бромистым этидием — флуоресцентным интелекалирующим красителем, количественно связывающимся с ДНК. Клетки с одного матраса были сняты раствором Версена и распределены в 3 эппендорфа. В каждом эппендорфе 1 мл среды содержал  $5 \times 10^5$  клеток. Для того, чтобы выявить зависимость эффективности источников от дозы и мощности дозы, мы в 1-й эппендорф помещали два источника (общая доза облучения 1,1 Гр), во 2-й — один источник (доза облучения 0,33 Гр), 3-й эппендорф без источника ИИ служил контролем. По окончании облучения эппендорфы центрифугировали и к осадку добавляли 0,5 мл раствора Версена, затем осадки ресуспендировали и переносили суспензию в пенициллиновые флаконы с покровными стеклами и 3 мл питательной среды, оставляя расти в течение следующих 96 часов. Анализ состава клеточной популяции, проведенный сразу после облучения, существенных различий в сравнении с необлученным контролем не выявил (рис. 2А), а через 96 часов после облучения регистрировали изменения в распределении клеток по содержанию ДНК по отношению к необлученному контролю (рис. 2 Б и В). Из гистограмм видна дозозависимая аккумуляция тетраплоидных клеток, что соответствует G2/M фазам клеточного цикла (18% в необлученном контроле, 30% после облучения в дозе 1,1 Гр и 25% — в дозе 0,33 Гр). Увеличивается также доля гиподиплоидных клеток (sub-G1 популяция): 4,8% в контроле и 7% после облучения. Почти втрое снижается концентрация клеток в облу-

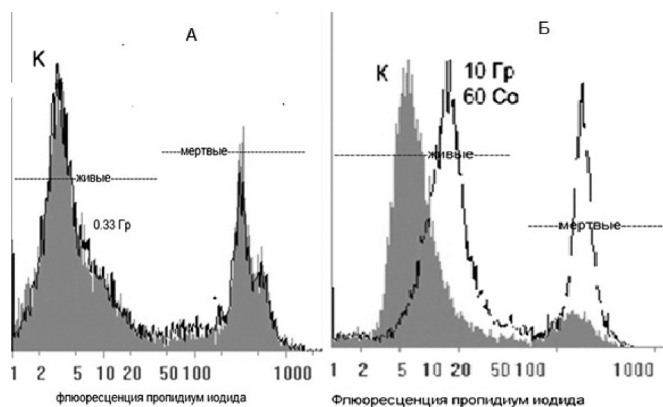


Рис. 1. Идентификация нежизнеспособных клеток HeLa G63 после облучения источниками  $^{169}\text{Yb}$  в дозе 0,33 Гр (А) и после облучения  $^{60}\text{Co}$  в дозе 10 Гр (Б) с помощью пропидиум иодида.

По оси абсцисс — интенсивность флюоресценции; по оси ординат — количество клеток (отн.ед.).

Нежизнеспособные клетки светят на 2 порядка ярче, чем живые клетки. Область от 1–20 — живые, от 100–1000 мертвые.

ченном образце (в контроле было 152,5 клеток в секунду, а в облученном образце 57,3 клеток в секунду) при исходно равных концентрациях при посеве клеток, равном количестве проанализированных клеток (12 000) и фиксированной скорости анализа клеток. Снижение концентрации клеток в облученных образцах может свидетельствовать как о необратимости блокирования клеток в G2/M, так и о снижении скорости роста клеток. Регистрация эффектов излучения  $^{169}\text{Yb}$  на протяжении 96 часов инкубации после облучения, а это 4 клеточных цикла (продолжительность одного клеточного цикла HeLa G63 — 24 часа) свидетельствует о включении механизмов пролонгации действия ИИ. Это отсроченные (задержанные) эффекты действия ИИ, которые следует учитывать при планировании режимов облучения опухолей.

Известно, что основными причинами необратимого блокирования клеток в G2/M фазах цикла являются нерепарированные повреждения наследственных структур клетки [7, 8]. Мы оценили эффективность каждого источника  $^{169}\text{Yb}$  в индукции асимметричных хромосомных повреждений (мосты и фрагменты в анафазе). Результаты анализа представлены на рис. 3, из которого видно, что все образцы  $^{169}\text{Yb}$  индуцировали увеличение уровня повреждений хромосом. При этом следует отметить, что по сравнению с необлученным контролем это увеличение было незначительным (4—9%). Очевидно, что в пределах исследуемых доз облучения выявить существенные различия по этому критерию сложно, хотя дозовая зависимость прослеживается. Можно также предположить, что разрывы ДНК, лежащие в основе образования хромосомных aberrаций, не являются единственной причиной гибели клетки после облучения источниками  $^{169}\text{Yb}$  в столь низких дозах. На этой же линии клеток ранее нами были оценены уровни aberrантных анафаз после облучения  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$ ,  $\beta$ -частицами  $^3\text{H}$  и рентгеновыми лучами. По эффективности индукции хромосомных повреждений образцы  $^{169}\text{Yb}$  соответствуют рентгеновым лучам. Доза в 1 Гр рентгеновского излучения индуцировала от 14 до 18,0% aberrаций в зависимости от стадии клеточного цикла.

Морфологический анализ состава клеточной популяции после облучения клеток HeLa G63 и ECV 304, представленный на рис. 4, показал, что после облучения их источниками ИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  включаются различные механизмы гибели клеток. Наряду с повреждениями генетического аппарата клетки имеют место разрывы ДНК и неправильное соединение разорванных концов (мосты в анафазе) (рис. 4 Б), клетки теряют свою жизнеспособность до наступления анафазы в метафазе, образуя аномальные метафазы и К-митоз (рис. 4 В, Г). Гибель клеток проходит как через митотическую катастрофу, так и через апоптоз (фрагментация клеточного ядра при сохранении целостности клеточной мембраны) (рис. 4 Б, В). После пролонгированного облучения (70 часов облучения, накопленная доза — 2,6 Гр) регистрировали некротические клетки (рис. 4, Д, Е) с фрагментированным клеточным ядром и с нарушениями целостности клеточной мембраны. Очевидно, что включение некротической формы гибели после пролонгированного облучения следует также учитывать при планировании режимов облучения опухолей. Некроз можно описать как неспецифическое набухание клетки и ее мембранных органелл, которое завершается нарушением их целостности. В результате разрывов

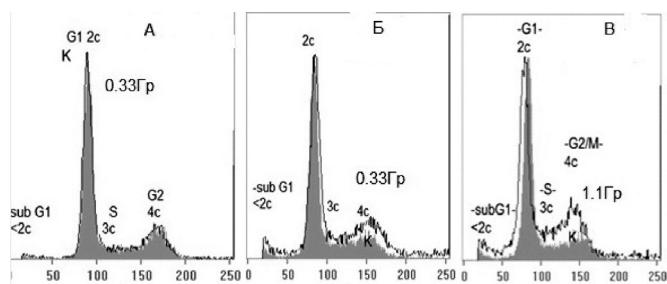


Рис. 2. Распределение клеток HeLa G63 по содержанию ДНК до (А) и через 96 часов (Б и В) после инкубации их с источниками  $^{169}\text{Yb}$ . По оси абсцисс — номер канала флуоресценции; по оси ординат — количество клеток (отн.ед.).

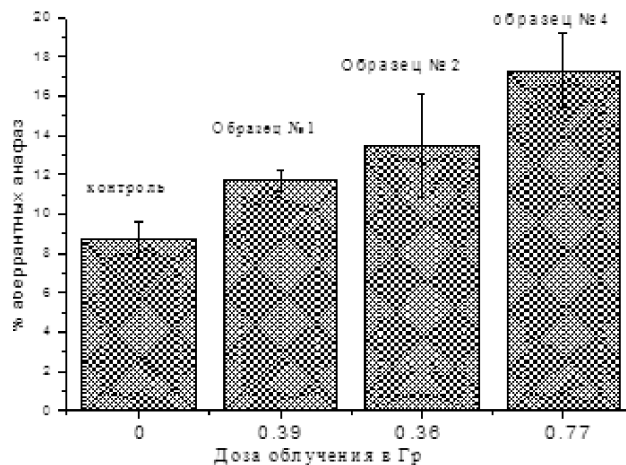


Рис. 3. Уровень асимметричных хромосомных aberrаций в клетках HeLa G63 индуцированный ИИ различных образцов  $^{169}\text{Yb}$ . По оси абсцисс — доза облучения в Гр; по оси ординат — процент aberrантных анафаз.

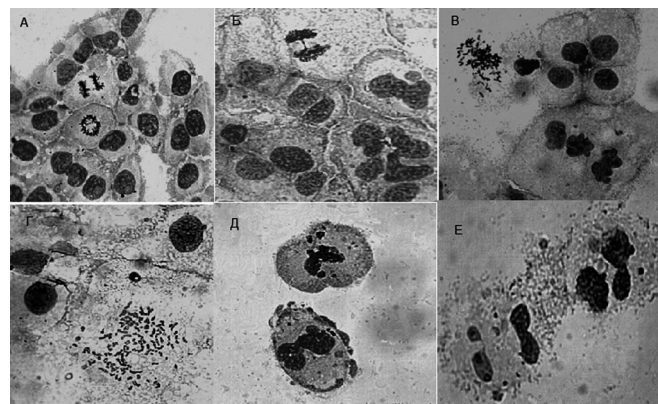


Рис. 4. Морфологический анализ популяции клеток HeLa G63 и ECV304, выращенных на покровных стеклах, после инкубации клеток с образцами  $^{169}\text{Yb}$  (увеличение 40x20):

А — клетки HeLa без облучения;  
 Б — клетки HeLa G63 через 48 часов после облучения образцами  $^{169}\text{Yb}$  (1,2 Гр); видна aberrантная анафаза (мост между хромосомами, разделяющимися на дочерние клетки), и полиплоидные клетки с морфологическими признаками апоптоза (фрагментация ядра при сохранении целостности мембраны);  
 В — клетки HeLa G63 через 96 часов после облучения  $^{169}\text{Yb}$ -образцами в дозе 1,2 Гр, наблюдается апоптоз и аномальная метафаза (нарушение расхождения хромосом по дочерним клеткам, или блокирование клеток в метафазе);  
 Г — клетки ECV 304 К-митоз (нарушение расхождения хромосом по дочерним клеткам, или блокирование клеток в метафазе, или метафазно/анафазный блок) после облучения образцами  $^{169}\text{Yb}$  (в дозе 1,2 Гр);  
 Д—Е — клетки HeLa G63 после пролонгированного облучения образцами  $^{169}\text{Yb}$  в дозе 2,6 Гр регистрируется и некроз (дробление ядра и нарушение целостности мембраны).

в плазматической мембране содержимое клетки оказывается во внеклеточном пространстве, что приводит к целому ряду осложнений. В отличие от некроза апоптоз является регулируемым процессом гибели клеток, который происходит при нормальном развитии клеток. Апоптоз подразделяется на апоптоз одноядерных клеток и митотическую катастрофу. Митотическая катастрофа — это тип клеточной гибели, который осуществляется как в ходе деления клетки, так и через короткое время после нерегулируемого/незавершенного митоза. Под митотической катастрофой принято понимать гибель клетки в результате грубых нарушений митоза, таких, как отставание хромосом в мета- и анафазе, К-митозы, мультиполюсные и мультигрупповые мета- и анафазы. Регистрация всех этих форм гибели после облучения источниками ИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  приводила к снижению концентрации клеток в облученных образцах. На рис. 5 представлены результаты эксперимента по оценке влияния облучения образцами  $^{169}\text{Yb}$  на рост клеток. В пробах «до-» и в различные сроки «после инкубации» клеток с образцами  $^{169}\text{Yb}$  просчитывали их концентрацию. Исходно концентрация клеток во всех пробах была одинаковой. Реализация эффектов облучения ИИ регистрировалась через 2 и 4 цикла удвоения (генерации) клеток. Из диаграмм видно, что уже через 48 часов (2 цикла удвоения) количество клеток в облученных образцах снижается по сравнению с необлученным контролем, при этом инкубация клеток с двумя образцами  $^{169}\text{Yb}$  одновременно (1,1 Гр) эффективнее ингибировала рост клеток по сравнению с облучением одним образцом (0,33 Гр). Эти два режима облучения отличались как дозой, так и мощностью дозы. В первом случае эти параметры были втрое больше. Очевидно, что исследуемые образцы  $^{169}\text{Yb}$  ингибируют рост клеток дозозависимым образом. Регистрация эффектов облучения ИИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  в отдаленные сроки после облучения и сохранение этих эффектов на протяжении нескольких клеточных генераций указывает на то, что под влиянием низких доз облучения происходит системное изменение метаболизма клетки. Включаются механизмы контроля в точках сверки (check point) и апоптотической гибели клетки, для реализации которой требуется определенный лаг-период, поскольку апоптоз состоит из ряда этапов:

- 1) индукция, или запуск программы апоптоза;
- 2) активация проапоптотических белков;
- 3) каскад каспаз, расщепляющих белки-мишени;
- 4) разрушение внутриклеточных органелл или их перестройка;
- 5) фрагментация клетки на апоптотические тельца;
- 6) подготовка клетки и ее фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками [9].

Из вышеизложенного следует, что облучение клеток ИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  приводит к нарушению прогрессии клеток по циклу, которое сопровождается блокированием клеток в G2/M фазах. Блокирование прогрессии клеток носило необратимый характер, что приводило к репопуляционным изменениям, снижению концентрации клеток в образцах в различные временные интервалы после облучения. Морфологический анализ клеток выявил включение апоптотической формы гибели не только и не столько в облученных клетках, сколько в их потомках, в которых регистрируются также и патологические митозы, нарушение митотического аппарата деления клеток. Аналогичные результаты были нами получены при хро-

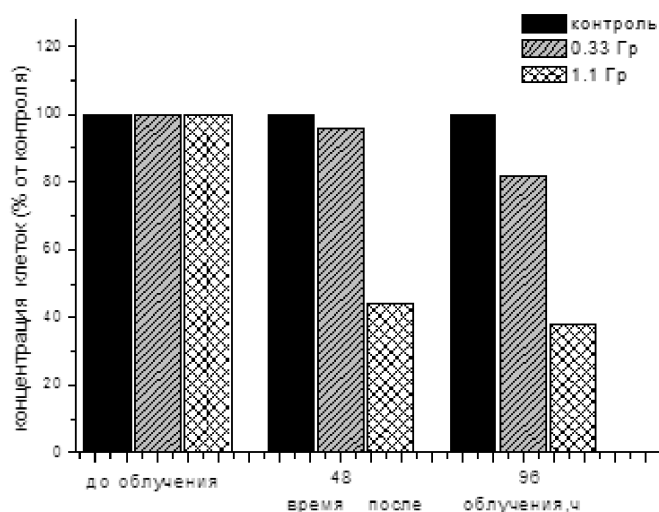


Рис. 5. Концентрация клеток в пробах до и в различные сроки после облучения образцами  $^{169}\text{Yb}$  (1,1 Гр) и (0,33 Гр).

ническом облучении клеток в дозах 0,21—20 сГр  $\beta$ -частицами, испускаемыми тритием, инкорпорированным в ДНК клеток китайского хомячка, линия V-79 [10]. Потомки облученных клеток стойко демонстрировали нарушение перехода из метафазы в анафазу на протяжении 120 исследованных нами генераций. Агенты, специфически действующие на делящиеся клетки, издавна привлекают внимание онкологов, поскольку активное деление — одна из особенностей опухолевых клеток. Некротическая форма гибели регистрируется только после продолжительного облучения клеток источниками  $^{169}\text{Yb}$ . Следует также подчеркнуть, что поскольку все эти патологии реализуются в отдаленные сроки после облучения, то это допускает возможность модификации эффекта облучения. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что испытанные источники ИИ на основе  $^{169}\text{Yb}$  обладают выраженным антипролиферативным эффектом, реализующимся в индукции апоптотической гибели потомков облученных клеток.

### Список литературы

1. Loft S.M., Coles I.P., Dale R.G. The potential of ytterbium 169 in brachytherapy: a brief physical and radiobiological assessment // *Br. J. Radiol.* — 1992. — Mar. — Vol. 65(771). — P. 252—257.
2. Акулиничев С.В., Антанович А.А., Бражкин В.В., Держиев В.И., Зибров И.П., Филоненко В.П. Источник для брахитерапии. Патент № 131302 от 23.05.2013.
3. Stepanov S.I., Konyshov V.N., Kotlovanova L.V. et al. Karyotyping of individual cells with flow cytometry // *Cytometry.* — 1996. — Vol. 23. — P. 279—283.
4. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* — 2005.
5. Dean P.N., Cray J.W., Dolbear F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry // *Cytometry.* — 1982. — 3. — P. 188—195.
6. «Assessment of cell viability using probes for membrane integrity» *Current Protocols in Cytometry.* — 1997, supplement 15, 9.2.1-9.2.14.
7. Durante M., Furusawa Y., Majima H. et al. Association between G2-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes // *Radiat. Res.* — 1999. — Vol. 151. — P. 670—676.
8. Гильяно Н.Я., Коневега Л.В., Степанов С.И. и др. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в куль-

туре  $\beta$  и  $\gamma$ -излучением от инкорпорированных и внешних источников.  $G_2$ -блок, индуцированный  $\beta$ -частицами  $^3\text{H}$ -тимидина и  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 1. — С. 108—116.

9. Jonathan E.C., Bernhard E.J., McKenna W.G. How does radiation kill cells? // Curr. Opin. Chem. Biol. — 1999. — 3. — P. 77—83.

10. Гильяно Н.Я., Большакова О.И., Лаврова Г.А. и др. Характеристика адаптивного ответа к действию  $\gamma$ -лучей, индуцированного малыми дозами  $^{14}\text{C}$  в фибробластах Китайского хомячка // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1998. — Т. 38, № 5. — С. 663—671.

Поступила 26.09.2015

#### References

1. Loft S.M., Coles I.P., Dale R.G. The potential of ytterbium 169 in brachytherapy: a brief physical and radiobiological assessment // Br. J. Radiol. — 1992. — Mar. — Vol. 65(771). — P. 252—257.

2. Акулиничев С.В., Антанович А.А., Бражкин В.В., Держигев В.И., Зибров И.П., Филоненко В.П. Источник для брахитерапии. Патент № 131302 от 23.05.2013.

3. Stepanov S.I., Konyshev V.N., Kotlovanova L.V. et al. Karyotyping of individual cells with flow cytometry // Cytometry. — 1996. — Vol. 23. — P. 279—283.

4. Watson J.V. Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics. — 2005.

5. Dean P.N., Cray J.W., Dolbeare F.A. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry // Cytometry. — 1982. — 3. — P. 188—195.

6. «Assessment of cell viability using probes for membrane integrity» Current Protocols in Cytometry. — 1997, supplement 15, 9.2.1-9.2.14.

7. Durante M., Furusawa Y., Majima H. et al. Association between  $G_2$ -phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes // Radiat. Res. — 1999. — Vol. 151. — P. 670—676.

8. Гильяно Н.Я., Конева Л.В., Степанов С.И. и др. Блокирование пролиферации эндотелиальных клеток человека в культуре  $\beta$  и  $\gamma$ -излучением от инкорпорированных и внешних источников.  $G_2$ -блок, индуцированный  $\beta$ -частицами  $^3\text{H}$ -тимидина и  $\gamma$ -квантами  $^{137}\text{Cs}$  // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2007. — Т. 47, № 1. — С. 108—116.

9. Jonathan E.C., Bernhard E.J., McKenna W.G. How does radiation kill cells? // Curr. Opin. Chem. Biol. — 1999. — 3. — P. 77—83.

10. Гильяно Н.Я., Большакова О.И., Лаврова Г.А. и др. Характеристика адаптивного ответа к действию  $\gamma$ -лучей, индуцированного малыми дозами  $^{14}\text{C}$  в фибробластах Китайского хомячка // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1998. — Т. 38, № 5. — С. 663—671.

Received 25.09.2015

## Effect of low doses of radiation $^{169}\text{Yb}$ - on proliferation and cell death in human cells in culture

Giliano N.Ya., Konevega L.V., Stepanov S.I., Zhurishkina E.V., Noskin L.A.

National Research Center «Kurchatov Institute»,

B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute,

Orlova Roscha, 1, Gatchina, Leningrad dist. 188300, Russia, e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru

*In this work we study the effect of sources of  $^{169}\text{Yb}$ - on the proliferation, progression of the cell cycle, apoptotic death and the level of chromosome aberrations in carcinoma (HeLa G63) and endothelial (ECV304) human cells in culture. It has been shown that exposure of cells by  $^{169}\text{Yb}$ - with doses 0.33—1.2 Gy leads to cell blocking in  $G_2/M$  phases of the cell cycle. We found that the blocking the progression of cells is dose dependent and become irreversible, resulting in repopulation changes. The  $^{169}\text{Yb}$  radiation also inhibited the growth of cells in a dose dependent manner. We found that the level of the chromosome aberrations induced in HeLa G63 cells by the ytterbium exposure of 1.1 Gy was close to the same level induced by X-rays exposure of 1 Gy. Morphological analysis of the cells identified of apoptotic form of cellular death, not only and not so much in irradiated cells, as their descendants. In the latter case we also recorded an abnormal mitosis, a damage of the mitotic apparatus of cell division. Necrotic form of cellular death was registered only after prolonged exposure of ytterbium irradiation. Observation of the irradiation effects for several cellular generations indicates that low doses of radiation induce systemic change of cellular metabolism, which was accompanied by activation of mechanism of «check-point» control and apoptosis. The observed manifestation of the damaging effect late after the irradiation by ytterbium sources may significantly contribute to the total effect of treatment, which is important in clinical practice.*

**Key words:** ytterbium 169, human cells in culture, chromosome aberrations, cell cycle, apoptosis, flow cytometry