

О МЕХАНИЗМЕ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА. ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К РАДИАЦИОННОМУ АДАПТИВНОМУ ОТВЕТУ С ПОМОЩЬЮ РАЗНЫХ КРИТЕРИЕВ

© А. М. Серебряный,¹ М. М. Антоцина,² А. В. Алещенко,¹ Н. И. Рябченко,² И. И. Пелевина³

¹ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва,

² Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск;

³ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва;

¹ электронный адрес: amserebr@sky.chph.ras.ru

У лимфоцитов периферической крови 15 здоровых доноров исследована способность к снижению радиочувствительности после облучения их в низкой (адаптирующей) дозе — радиационному адаптивному ответу (АО). Оценку изменения радиочувствительности после облучения клеток в адаптирующей и затем в высокой (проявляющей) дозе по сравнению с облучением только в проявляющей дозе производили по частоте нестабильных aberrаций хромосом. Использовали три показателя: долю клеток с aberrациями хромосом среди всех просмотренных клеток (А), число aberrаций хромосом на 1 просмотренную клетку (В) и число aberrаций хромосом на 1 aberrантную клетку (С). Обнаружено, что обследованных доноров можно разделить на 4 группы: 1-я — лица, у которых АО не выявили ни по одному показателю; 2-я — лица с АО по показателям только А и В; 3-я — лица с АО по показателям только В и С; 4-я — лица с АО по всем трем показателям. Общепринятая репарационная модель формирования АО объясняет появление 3-й и 4-й групп доноров, но не может объяснить механизм возникновения 2-й группы. Для понимания механизма возникновения АО и причин различий в оценках АО по разным критериям у всех доноров были проанализированы распределения просмотренных метафаз по числу aberrаций в них. Найдено, что у доноров 2-й группы в распределении, наблюдающемся после двойного облучения, по сравнению с распределением после облучения только в дозе 1.0 Гр достоверно возрастает доля клеток, не содержащих aberrаций хромосом. Таким образом, у доноров этой группы АО формируется в результате изменения доли клеток класса 0 — популяционного сдвига, приведшего к этому изменению. Аналогичный сдвиг наблюдается и в распределениях метафаз у всех доноров 4-й группы, но отсутствует у доноров 3-й группы. Полученные данные показывают, что АО лимфоцитов крови является, вероятно, результатом нескольких процессов: активизации репарации предмутационных повреждений генома, популяционных сдвигов, выражающихся в изменении доли неповрежденных клеток, и, возможно, активизации апоптотической гибели клеток. Комплексный характер природы АО в разной степени отражается в каждом из критериев оценки радиочувствительности.

Ключевые слова: лимфоциты, облучение, адаптивный ответ, клеточный состав.

Одним из последствий действия ионизирующей радиации в малых дозах является изменение радиочувствительности облученных объектов — ее уменьшение (адаптивный ответ — АО) или повышение. Применительно к лимфоцитам периферической крови человека феномен АО впервые был описан в 1984 г. (Olivieri et al., 1984). Авторы показали, что лимфоциты крови человека, облученные в малой дозе γ -лучами, становятся более устойчивыми к облучению в большой (ударной, проявляющей) дозе в фазе G₂ клеточного цикла. В последующие годы феномен подвергался интенсивному изучению. В качестве критериев радиочувствительности использовали разные показатели, но наиболее часто учитывают частоту клеток с aberrациями хромосом и микроядерный тест в сочетании с цитокинетическим блоком при действии цитохалазина В.

Однако, несмотря на столь длительное изучение АО, его механизм все еще остается малопонятным. Большинство исследователей полагают, что снижение радиочувст-

вительности клеток происходит в результате изменения их репарационного потенциала: облучение в малой дозе индуцирует синтез de novo ферментов репарации, последние обеспечивают повышенную устойчивость клеток к последующему облучению в высокой дозе (см. обзоры: Stecca, Gerber, 1998; Wojcik, Shadley, 2000). Однако недавно, используя микроядерный тест, мы показали, что адаптивный ответ у лимфоцитов периферической крови возникает на базе двух процессов (Серебряный и др., 2003, 2004). Один из этих процессов внутриклеточный — интенсификация репарации, этот процесс обеспечивает реальное снижение радиочувствительности клеток после действия адаптирующего облучения. Второй процесс — популяционный. Сущность его состоит в том, что в основе изменения радиочувствительности лежит не изменение числа поврежденных клеток, а изменение состава популяции — увеличение доли неповрежденных двуядерных клеток.

В настоящей работе выясняли, вносит ли вклад изменение состава популяции лимфоцитов в механизм форми-

рования АО. При этом в качестве критерия повреждающего действия радиации использовали частоту возникновения клеток с абберациями хромосом.

Таблица 1

Реакции лимфоцитов периферической крови человека на облучение

Доза облучения, Гр	Доля абберрантных клеток (А), %	Число абберраций хромосом на 1 просмотренную клетку (В)	Число абберраций хромосом на 1 абберрантную клетку (С)
1-я группа			
1.0	86.0 ± 3.5	2.45 ± 0.21	2.85 ± 0.22
0.05 + 1.00	87.0 ± 3.4	2.77 ± 0.21	3.18 ± 0.21
1.0	75.0 ± 4.3	2.26 ± 0.23	3.01 ± 0.26
0.05 + 1.00	70.0 ± 4.6	1.69 ± 0.18	2.41 ± 0.20
1.0	77.0 ± 4.2	2.09 ± 0.18	2.75 ± 0.20
0.05 + 1.00	80.0 ± 4.0	1.80 ± 0.16	2.25 ± 0.17
1.0	77.0 ± 4.2	2.72 ± 0.28	3.53 ± 0.31
0.05 + 1.00	79.0 ± 4.1	2.25 ± 0.19	2.85 ± 0.20
2-я группа			
1.0	87.0 ± 3.4	2.69 ± 0.20	3.09 ± 0.20
0.05 + 1.00	71.0 ± 4.5 ^a	1.90 ± 0.17 ^a	2.68 ± 0.17
1.0	77.0 ± 4.2	2.16 ± 0.20	2.80 ± 0.21
0.05 + 1.00	64.0 ± 4.8 ^b	1.48 ± 0.17 ^a	2.31 ± 0.19
1.0	88.0 ± 3.2	2.80 ± 0.21	3.18 ± 0.20
0.05 + 1.00	76.0 ± 4.3 ^b	2.28 ± 0.19	3.00 ± 0.18
3-я группа			
1.0	75.0 ± 4.3	2.69 ± 0.25	3.59 ± 0.26
0.05 + 1.00	69.0 ± 4.6	1.81 ± 0.19 ^a	2.62 ± 0.22 ^a
1.0	77.0 ± 4.2	2.50 ± 0.21	3.25 ± 0.22
0.05 + 1.00	82.0 ± 3.8	1.93 ± 0.15 ^b	2.35 ± 0.15 ^b
1.0	74.0 ± 4.4	2.20 ± 0.22	2.97 ± 0.24
0.05 + 1.00	64.0 ± 4.8	1.50 ± 0.15 ^a	2.34 ± 0.18 ^b
1.0	76.0 ± 4.3	2.17 ± 0.22	2.85 ± 0.24
0.05 + 1.00	71.0 ± 4.5	1.43 ± 0.13 ^a	2.01 ± 0.13 ^a
4-я группа			
1.0	75.0 ± 4.3	2.62 ± 0.24	3.49 ± 0.24
0.05 + 1.00	61.0 ± 4.9 ^b	1.71 ± 0.20 ^a	2.80 ± 0.23 ^b
1.0	85.0 ± 3.6	2.38 ± 0.17	2.80 ± 0.16
0.05 + 1.00	65.0 ± 4.8 ^b	1.43 ± 0.14 ^a	2.20 ± 0.15 ^a
1.0	80.0 ± 4.0	2.73 ± 0.26	3.41 ± 0.28
0.05 + 1.00	64.0 ± 4.8 ^b	1.49 ± 0.17 ^a	2.33 ± 0.20 ^a
1.0	79.0 ± 4.1	2.30 ± 0.19	2.91 ± 0.18
0.05 + 1.00	70.0 ± 4.9 ^b	1.24 ± 0.15 ^a	2.07 ± 0.20 ^a

Материал и методика

Донорами служили здоровые люди обоего пола в возрасте 20—35 лет.

Использовали стандартную методику культивирования лимфоцитов периферической крови (Hangesford, 1965). К 1 мл гепаринизированной крови добавляли 8 мл среды RPM1, содержащей 15 % эмбриональной телячьей сыворотки. Деление лимфоцитов стимулировали фитогеммагглютинином (ФГА, 10 мкг/мл; Панэко, Москва). Культуру лимфоцитов инкубировали в течение 50 ч в присутствии ФГА при 37 °С. Для накопления метафаз в культуральную среду за 2 ч до фиксации вводили демеколцин до концентрации 0.2 мкг/мл. После окончания культивирования клетки обрабатывали гипотоническим раствором КС1 (0.075 М) в течение 15 мин при 37 °С, фиксировали в смеси метанола с ледяной уксусной кислотой (3 : 1) и наносили на предметные стекла. Высохшие мазки окрашивали азуром—эозином. В полученных препаратах подсчитывали число поврежденных клеток и число метафаз с абберациями хромосом. У каждого донора на одну точку анализировали 100 метафаз. Спонтанная частота клеток с одиночными абберациями составляла 0—3 клетки на 100 просмотренных клеток.

Культуру лимфоцитов облучали γ-квантами ⁶⁰Со при мощности дозы 0.2 Гр/мин. Облучение в адаптирующей дозе 0.05 Гр производили через 24 ч после начала культивирования. Через 48 ч после стимуляции ФГА их облучали в проявляющей дозе 1.0 Гр. Параллельно часть проб либо вообще не облучали, либо облучали только в дозе 1.0 Гр. Затем добавляли демеколцин для накопления метафаз и через 2 ч (50 ч после стимуляции ФГА) фиксировали. Поскольку облучение в высокой дозе проводили в фазе G₂ клеточного цикла, все обнаруженные абберации были хроматидного типа (одиночные фрагменты, обмены и изолокусные разрывы).

Достоверность наличия АО оценивали с помощью критерия χ² и t-критерия Стьюдента (Урбах, 1964). Сравнения распределений метафаз по числу аббераций хромосом в них с помощью критериев Манна—Уитни и Колмогорова—Смирнова проводили, используя пакет программ Statistica.

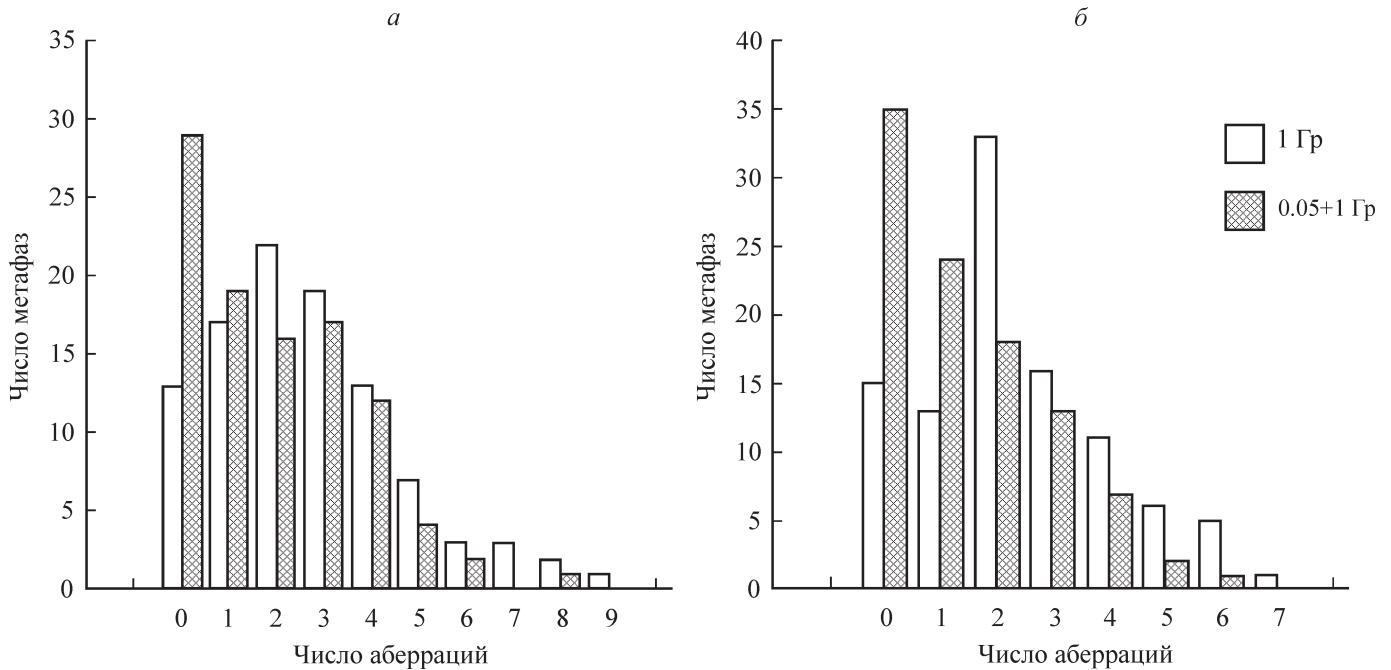
Результаты и обсуждение

У лимфоцитов 15 доноров была изучена способность к АО. Для оценки повреждающего действия радиации использовали три критерия: долю клеток с абберациями хромосом среди всех просмотренных клеток (А), число аббераций хромосом на 1 просмотренную клетку (В) и число аббераций хромосом на 1 абберрантную клетку (С). Было обнаружено, что АО сразу по всем трем критериям выявился лишь у 4 доноров; у других 4 доноров АО не выявили ни по одному показателю (табл. 1), у остальных доноров АО выявили по 1—2 показателям в разных сочетаниях. Наиболее часто АО наблюдали по показателю В, т. е. числу аббераций на 1 просмотренную клетку (10 из 11 доноров с АО).

Для анализа возможных причин, по которым АО выявляется не по всем критериям, обследованных индиви-

Примечание к табл. 1 и 2. Группы лиц: 1-я — адаптивный ответ (АО) не выявили ни по одному показателю; 2-я группа — АО выявили по показателям А и В, но не С; 3-я — АО выявили по показателям В и С; 4-я — АО выявили по всем трем показателям. ^{a-b} P < 0.01, 0.05 и 0.001 соответственно; в каждом варианте просмотрено по 100 клеток.

дуумов разделили на 4 группы: 1-я — лица, у которых АО не выявили ни по одному показателю (4 человека); 2-я — 2 человека, у которых АО выявили по показателю А (доля



Распределения лимфоцитов по числу aberrаций хромосом у двух доноров (а, б) после облучения клеток в дозе 1.0 Гр и после последовательного облучения в дозах 0.05 и 1.00 Гр.

а — донор с адаптивным ответом по показателям А (доля aberrантных клеток) и В (число aberrаций на 1 просмотренную клетку), но без АО по показателю С (число aberrаций на 1 aberrантную клетку); б — донор с адаптивным ответом по всем трем показателям — А, В и С.

aberrантных клеток) и В (число aberrаций на 1 просмотренную клетку), а также 1 человек, у которого АО есть только по показателю А, но у всех трех не было АО по показателю С; 3-я — группа, у которой АО выявили по показателям В и С; 4-я — группа, у которой АО выявили по всем трем показателям (табл. 1).

Общепринятая репарационная модель формирования АО может полностью объяснить появление 3-й и 4-й групп доноров: репарация, индуцированная облучением в малой дозе, удаляет часть предмутационных повреждений, в результате чего снижаются и число aberrаций хромосом в aberrантной клетке, и число aberrаций хромосом на просмотренную клетку (3-я группа). Если же репарация удаляет все предмутационные повреждения, то наблюдается и снижение доли aberrантных клеток в популяции (4-я группа). Однако на базе репарационной гипотезы трудно объяснить появление 2-й группы доноров, у которых наблюдается АО по показателям А и В, но нет АО по показателю С, так как репарация даже части предмутационных повреждений в клетке должна приводить к изменению этого показателя.

Для понимания механизма возникновения АО мы сравнили распределения просмотренных метафаз по числу aberrаций после облучения в дозе 1.0 Гр с распределением после последовательного облучения в дозах 0.05 и 1.00 Гр с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни и Колмогорова—Смирнова. Выяснилось, что для всех 15 доноров эти распределения нельзя признать различными. Однако более детальный анализ показал, что во многих случаях после двойного облучения в распределении достоверно возрастает доля метафаз, не содержащих aberrаций хромосом (класс 0). Например, на рисунке представлены распределения метафаз для двух доноров: одного из 2-й и одного из 4-й группы. Видно, что доля метафаз класса 0 после последовательного облучения лим-

фоцитов в дозах 0.05 и 1.00 Гр выше, чем после однократного облучения в дозе 1.0 Гр. Результаты количественной оценки этих различий суммированы в табл. 2. Оказалось, что у 6 доноров из 15 доля метафаз возрастает статистически значимо, а еще у 1 повышение не достигает статистически значимого уровня ($P = 0.06$), но тенденция к повышению очевидна. Интересно, что эти 7 доноров не распределены равномерно среди всех обследованных, а присутствуют только в группах 2 и 4, в этих группах также нет доноров без достоверного повышения доли клеток класса 0.

Группа 2 — это доноры, у которых АО наблюдается по показателям А и В, но нет АО по показателю С. Возрастание доли клеток класса 0 объясняет их механизм АО: после увеличения доли клеток этого класса в популяции снижаются доля aberrантных клеток и число aberrаций на просмотренную клетку, но не число aberrаций на aberrантную клетку.

Увеличение доли клеток класса 0 вносит вклад и в формирование АО в 4-й группе доноров (АО по трем показателям). При двойном облучении доля клеток класса 0 у всех доноров этой группы достоверно выше, чем при облучении только в дозе 1.0 Гр (табл. 2; см. рисунок, б), и наблюдается АО по показателю А. Напротив, в группе 3 (нет АО по показателю А) не наблюдается достоверно роста доли клеток класса 0 (табл. 2); возможно, поэтому не наблюдается АО по показателю А. Создается впечатление, что АО по показателю А в популяции критически зависит от закономерностей варьирования доли клеток класса 0 в популяции.

Естественен вопрос о том, по каким причинам происходит изменение численности клеток этого класса. Можно обсуждать три возможные причины: 1) возрастание дополнительной (к ФГА) стимуляции лимфоцитов адаптирующим облучением; 2) появление неповрежденных кле-

Т а б л и ц а 2

Доля метафаз без aberrаций хромосом
в популяции лимфоцитов после облучения
в дозах 1.0 и 0.05 + 1.00 Гр

Число метафаз без aberrаций хромосом из 100 просмотренных после облучения в разных дозах		Достоверность различий между а и б
1.0 Гр (а)	0.05 + 1.00 Гр (б)	
1-я группа		
13	14	>0.05
25	30	>0.05
24	20	>0.05
23	21	>0.05
2-я группа		
13	29	<0.01
23	36	=0.06
12	24	<0.05
3-я группа		
23	31	>0.05
23	18	>0.05
26	36	>0.05
24	29	>0.05
4-я группа		
25	39	<0.05
15	35	<0.01
20	36	<0.05
21	40	<0.01

Примечание. Использовали точный критерий Фишера.

ток вследствие полной репарации предмутационных повреждений у части поврежденных клеток (Рябченко и др., 1996); 3) гибель поврежденных клеток. Однако для выбора между этими возможностями необходимы более детальные и углубленные исследования.

Следует отметить, что среди клеток, облученных в дозе 1.0 Гр, практически во всех случаях присутствуют клетки с большим числом aberrаций хромосом, достигающим 11. Среди клеток, облученных в двух дозах, доля этих клеток существенно ниже. Трудно представить, что возможно полноценное их восстановление за счет работы системы эксцизионной или рекомбинационной репарации. Нам кажется, что освобождение популяции от таких клеток происходит в результате их апоптотической гибели. В этом случае роль адаптирующего облучения может

заключаться в активизации этого пути восстановления целостности популяции. Отметим, что возможный вклад апоптоза в механизм АО ранее уже обсуждался в литературе (см. обзор: Боднарчук, 2003), однако окончательное мнение по этому вопросу не было сформировано.

Таким образом, описанные результаты позволяют утверждать, что АО лимфоцитов крови человека является, вероятно, результатом нескольких процессов: активизации репарации предмутационных повреждений генома, популяционных сдвигов, выражающихся в изменении доли неповрежденных клеток, и, возможно, активизация их апоптотической гибели. Комплексный характер природы АО предопределил, вероятно, неудачи попыток выявить влияние какого-то одного из перечисленных факторов на формирование АО. Комплексный механизм формирования АО наиболее полно отражается в показателе В.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-48909).

Список литературы

- Боднарчук И. А. 2003. Анализ роли репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиационно-индуцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих. Радиационная биология. Радиоэкология. 43 (1) : 19—28.
- Рябченко Н. И., Антошина М. М., Насонова В. А., Фесенко Э. В. 1996. Анализ распределения по клеткам aberrаций хромосом, индуцированных в лимфоцитах человека после однократного облучения и в условиях предварительного адаптирующего воздействия. Радиационная биология. Радиоэкология. 36 (6) : 825—833.
- Серебряный А. М., Алещенко А. В., Готлиб В. Я., Кудряшова О. В., Семенова Л. П., Пелевина И. И. 2003. Клеточный состав популяции лимфоцитов и радиационный адаптивный ответ. Цитология. 45 (1) : 81—85.
- Серебряный А. М., Алещенко А. В., Готлиб В. Я., Кудряшова О. В., Семенова Л. П., Пелевина И. И. 2004. О новом механизме формирования адаптивного ответа. Радиационная биология. Радиоэкология. 44 (6) : 653—656.
- Урбах В. Ю. 1964. Биометрические методы. М.: Наука. 415 с.
- Hangesford D. A. 1965. Stain Techn. 40 : 333—338.
- Olivieri G., Bodycote A., Wolff S. 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. Science. 223 : 594—597.
- Stecca C., Gerber G. B. 1998. Adaptive response to DNA-damaging agents — a review of potential mechanisms. Biochem. Pharmacol. 55 : 941—951.
- Wojcik A., Shadley J. D. 2000. The current status of the adaptive response to ionizing radiation in mammalian cells. Human and Ecological Risk Assessment. 6 : 281—300.

Поступила 19 IV 2007

THE MECHANISMS OF ADAPTIVE RESPONSE. ESTIMATION OF CAPACITY
OF HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES TO RADIATION ADAPTIVE RESPONSE
USING DIFFERENT CRITERIA

A. M. Serebryani,¹ M. M. Antoshchina,² A. V. Aleschenko,¹ N. I. Ryabchenko,² I. I. Pelevina³

¹ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, ² Medical Radiological Research Center RAMS, Obninsk, and ³ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow;

¹ e-mail:amserebr@sky.chph.ras.ru

Blood lymphocytes of 15 healthy donors have been investigated for the ability to decrease their radiosensitivity after treatment with low dose irradiation named radioinduced adaptive response (AR). The unstable chromosome aberrations were used to evaluate the radiosensitivity change after irradiation of cells with low adaptive dose (5 cGy) and subsequent high challenge dose (1.0 Gy) in comparison with the effect of challenge irradiation only. Three indexes were used: the frequency of cells with aberrations in all analyzed cells (A), the number of chromosome aberrations per cell (B) and the number of chromosome aberrations per one aberrant cell (C). It has been discovered that all donors examined can be divided into four groups: 1 — individuals which cells did not show AR by all indexes used; 2 — individuals which cells showed AR by indexes A and B, but not C; 3 — AR was demonstrated by indexes B and C; 4 — AR was confirmed by all three indexes. Generally accepted repair model for AR formation explains only the case of donor groups 3 and 4, but can not explain the mechanism leading to the case of group 2. For understanding this mechanism, the distribution of metaphases by the number of chromosome aberrations per cell was analyzed for each donor. It was shown that the part of cells without aberrations in group 2 donors increased significantly after treatment with the adaptive and challenge irradiation in comparison with that after irradiation with challenge dose only. The conclusion is that in this case AR is formed as a result of change in the frequency 0 cell class — population shift. The analogous shift was observed in the distributions of metaphases for all donors of the group 4, but was absent in the group 3 donors. The data obtained suggest that AR of blood lymphocytes might be a result of several processes: activation of submutational genome damage repair; population shifts manifested by the change in the part of undamaged cells; and, possibly, activation of apoptotic cell death. The complex nature of AR affects each of radiosensitivity evaluation criteria to a different extent.

Key words: lymphocytes, irradiation, adaptive response, cell population composition.
