

АДАПТИВНЫЙ ОТВЕТ В РАЗНЫХ МИТОТИЧЕСКИХ ЦИКЛАХ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ

© И. И. Пелевина,^{1,*} А. В. Алещенко,² М. М. Антощина,³ О. В. Боева,¹ В. Я. Готлиб,¹
О. В. Кудряшова,¹ Е. Ю. Лизунова,¹ А. Н. Осипов,¹ Н. И. Рябченко,²
Л. П. Семенова,² А. М. Серебряный²

¹ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН,

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва,

и ³ Медицинский радиологический центр РАМН, Обнинск;

* электронный адрес: pele@chph.ras.ru

В необлученных потомках облученных лимфоцитов крови человека при метафазном анализе изучали частоту клеток с абберациями хромосом и число аббераций на клетку. Одновременно методом ДНК-комет исследовали фрагментацию ДНК (двунитевые разрывы ДНК). Для исследования адаптивного ответа стимулированные фитогемагглютинином лимфоциты облучали в адаптирующей дозе 0.05 Гр через 24 ч и в ударной дозе 1 Гр через 48 ч после стимуляции. Для идентификации 1—4-го митозов добавляли 5-бромдезоксисуридин. Обнаружено, что после облучения в проявляющей дозе частота хромосомных аббераций повышена во всех митотических циклах; также повышен и уровень двунитевых разрывов ДНК. При сочетанном адаптирующем и проявляющем облучении адаптивный ответ индуцируется в 1-м и 2-м митотических циклах (соответственно при фиксации через 48 и 72 ч после стимуляции) у большинства индивидуумов, но отсутствует в 3-м и 4-м митозах. В 1-м митозе (1 Гр через 48 ч после стимуляции) обнаруживаются только абберации хроматидного типа, во всех последующих — преимущественно хромосомного. Исследования методом ДНК-комет показало, что адаптивный ответ регистрируется через 48—72 ч, но недостоверен через 96 ч после стимуляции. Делается вывод о том, что в необлученных поколениях облученных лимфоцитов обнаруживается нестабильность генома; проявляется адаптивный ответ (до 3-го митоза), который обусловлен уменьшением числа аббераций хроматидного и(или) хромосомного типов, а также увеличением фрагментации ДНК. Предполагается, что двунитевые разрывы ДНК могут выступать сигнальными повреждениями для индукции адаптивного ответа.

Ключевые слова: адаптивный ответ, абберации хромосом, лимфоциты крови человека, метод ДНК-комет, нестабильность генома, поколения облученных клеток, фрагментация ДНК.

Адаптивный ответ (АО) — повышение резистентности к воздействию агентов разной природы в высоких ударных (повреждающих) дозах после воздействия тех же или других агентов в малых (адаптирующих) дозах. Со времени открытия этого эффекта на растениях (Куликов и др., 1971) и затем на бактериях (Samson, Cairns, 1977) он был достаточно хорошо изучен, были установлены многие закономерности, обуславливающие его индукцию и условия формирования. Интерес к феномену АО велик, предполагается, что это общий механизм защиты всего живого от неблагоприятных факторов, выработанный в эволюции, феномен, который, возможно, необходимо учитывать при выявлении групп риска, лечении злокачественных новообразований и возникновении хронических болезней человека (Пелевина и др., 1999; Ahmed, Li, 2008; Jiang et al., 2008).

Однако вопросы трактовки АО и его механизмов сложны. Существует много механизмов, в той или иной степени объясняющих индукцию АО. Так, в течение многих лет и по настоящее время главенствующим механизмом была гипотеза индукции и активации систем репарации ДНК после облучения в малых дозах; доказано, что

для формирования АО необходимы активация поли-АДФ-рибозополимеразы, синтез целого ряда белков и активация определенных групп генов, связанных с репарацией ДНК и стрессовой реакцией клеток (Coleman et al., 2005). Предполагаются также индукция систем антиоксидантной защиты (Wiencke et al., 1986; Shadley et al., 1987; Bravard et al., 1999) и торможение клеточного цикла (что увеличивает время для репарации) (Salone et al., 1996). Большое значение в индукции АО играют сигнальные пути — цитокины, кластерины, активация протеинкиназы С и др. (Tarjo, Jacob, 2007). В адаптированных клетках отмечается повышенный уровень активных форм кислорода и NO, которые, возможно, и являются ключевыми молекулами сигнальных путей (Coates et al., 2004; Matsmoto, Ohnishi, 2004). Уменьшение уровня повреждений ДНК может быть связано и с предотвращением повреждений до их возникновения (Cramers et al., 2005).

Полученные нами и другими авторами в последние годы данные показывают, что индукция адаптивного ответа зависит от многих факторов, что АО подвержен высокой степени интер- и интраиндивидуальной вариабельности как по частоте проявления (6—78 %), так и по сте-

пени уменьшения эффекта облучения в высокой дозе (11—32 %) (Shadley, Wiencke, 1989; Zhang, 1995; Пелевина и др., 2007a). Выраженность АО зависит от мощности дозы, времени между облучениями в малой и высокой дозах, генетических особенностях организма, фазы клеточного цикла (в которой происходит облучение), критериев оценки, времени оценки эффекта и других факторов, неоднократно обсуждавшихся (см., например: Bosi, Olivieri, 1989; Kalina, Némethová, 1997; Ryabchenko et al., 1998; Рябченко и др., 2004; Пелевина и др., 2007a; Серебряный и др., 2008).

Следует также учитывать, что после облучения в малой адаптирующей дозе и последующего в высокой дозе могут наблюдаться синергизм и повышение радиочувствительности (Hain et al., 1992; Пелевина и др., 1999; Sorensen et al., 2002).

Еще один важный факт, полученный относительно недавно: непосредственно необлученные клетки могут оказаться адаптированными, если они контактируют с адаптированными облучением клетками (Iyer, Lehnert, 2002a), т. е. путем эффекта свидетеля (bystander effect). Два основных механизма, объясняющих это явление, — высвобождение диффундирующих сигнальных молекул и межклеточные взаимодействия (Iyer, Lehnert, 2002b; Mothersill, Seymour, 2004).

Если говорить о проявлении АО на уровне организма, то, по-видимому, необходимо учитывать, что хроническое или однократное облучение в малых дозах индуцирует вышеупомянутые процессы, например, в клетках кровеносной системы. Но поскольку происходит постоянная смена клеток, непонятно будет ли формироваться АО в необлученных поколениях облученных клеток.

Поэтому целью данной работы являлось сравнительное изучение цитогенетических и молекулярно-биологических повреждений и проявления адаптивного ответа в поколениях облученных лимфоцитов крови человека.

Материал и методика

Методом метафазного анализа aberrаций хромосом изучали проявление адаптивного ответа. Этот метод широко применяется для оценки повреждения генома при воздействии ионизирующей радиации и других агентов (Севаньяев, 1987; Рябченко и др., 2004). В тех же условиях эксперимента изучали проявление АО методом ДНК-комет (Пелевина и др., 2007b).

Исследование aberrаций хромосом и степени фрагментации ДНК методом ДНК-комет проводили на стимулированных к пролиферации фитогемагглютинином (ФГА) лимфоцитах периферической крови в необлученных поколениях облученных клеток в разных митотических циклах. Лимфоциты культивировали в термостате при 37 °С в среде RPMI 1640 с добавлением 7 мкг/мл ФГА, 20 % сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков в течение 24—96 ч. Все реактивы фирмы ПанЭко (Москва).

Были проведены следующие серии экспериментов: контроль, облучение в адаптирующей дозе 5 сГр через 24 ч после стимуляции ФГА, облучение в повреждающей дозе 1 Гр через 48 ч после стимуляции, сочетанное облучение в адаптирующей дозе 0.05 Гр через 24 ч и в повреждающей дозе 1 Гр через 48 ч после стимуляции.

Для изучения частоты aberrаций хромосом вводили демеколцин в дозе 0.2 мкг/мл (Sigma, США) за 2 ч до

фиксации. При посеве клеток в культуру вводили 5-бромдезоксигуанидин (5-БДУ; $1 \cdot 10^{-5}$ М; ПанЭко, Москва) для отнесения метафаз к определенному (1—4-му) митозу: в 1-м митозе все хроматиды темноокрашенные, во 2-м одна хроматида светлая, а вторая — темная (арлекиновая окраска), в 3-м и 4-м митозах имеются полностью светлые хроматиды и хроматиды с арлекиновой окраской. Подсчитывали все типы aberrаций хромосом — хромосомные и хроматидные, как правило, в 100 метафазах.

Для исследования фрагментации ДНК, обусловленной преимущественно двунитевыми разрывами, использовали метод ДНК-комет при нейтральном уровне pH. Суть метода заключается в том, что ДНК иммобилизованных в агарозу единичных клеток подвергается электрофорезу: при этом фрагментированная ДНК выходит из ядра клетки, образуя «хвост» кометы. Количество двунитевых разрывов (ДР) ДНК прямо пропорционально длине хвоста кометы и содержанию ДНК в нем (Пелевина и др., 2007b). Все реактивы фирмы ПанЭко (Москва).

Для исследования ДР ДНК, непосредственно индуцированных ионизирующим облучением, облучение клеток, иммобилизованных в агарозу, проводили при 4 °С. Клетки лизировали через 30—40 с после облучения.

После окраски слайдов акридиновым оранжевым анализ ДНК-комет осуществляли на люминесцентном микроскопе Люмам Р-8 (ЛОМО, Россия) с использованием системы визуализации микрофотоизображений Микромед-1600-3ф (ЛОМО, Россия). Для анализа ДНК-комет использовали программу Comet score (TriTek Corp.). Оценивали момент хвоста ДНК-комет (Оливе-момент хвоста), равный произведению расстояния от центра ядра до центра плотности хвоста кометы на % ДНК в хвосте.

Статистическую обработку результатов всех измерений проводили стандартными методами (Лакин, 1973).

Результаты

При изучении частоты нестабильных aberrаций хромосом с использованием метафазного анализа и бромдезоксигуанидина в 1—4-м митотических циклах лимфоцитов после воздействия радиации в малой (5 сГр через 24 ч после стимуляции клеток ФГА), высокой (1 Гр через 48 ч после стимуляции клеток ФГА) дозах и их сочетанного действия были исследованы: частота клеток с aberrациями хромосом, число aberrаций на клетку, типы aberrаций хромосом, зависимость характера изменения радиочувствительности от времени фиксации клеток после облучения в ударной дозе. Всего было обследовано 8 человек.

Анализ распределения клеток в 1—4-м митозах через разное время после стимуляции ФГА показал, что пики 1-х митозов наблюдаются через 50 ч, 2-х — через 72, 3-х — через 96 ч. По времени вступления в цикл и скорости движения по циклу популяция лимфоцитов неоднородна, что уже отмечалось и ранее (Севаньяев, 1987; Wojcik et al., 1996a).

После облучения в дозе 1 Гр обнаружено, что наибольшее число aberrантных клеток наблюдается при первой фиксации через 50 ч после стимуляции ФГА и через 2 ч после облучения в ударной дозе в клетках 1-го митоза. В этом случае частота aberrантных клеток в среднем составляет около 80 %, число aberrаций на просмотренную клетку колеблется от 1.92 до 3.67. Все aberrации хроматидного типа; это подтверждает, что проявляющее облу-

Таблица 1

Частота клеток с aberrациями хромосом и число aberrаций на клетку в разных митотических циклах после облучения в дозе 1 Гр в зависимости от времени фиксации и номера митоза

Время фиксации, ч	Номер митоза			
	1-й	2-й	3-й	4-й
Доля клеток с aberrациями, %				
50 ^a	79.5 ± 2.1	—	—	—
72 ^a	15.5 ± 2.1	25.6 ± 0.7	12.6 ± 1.3	—
96 ^b	25.7	17.1	11.1	9.24
Число aberrаций на просмотренную клетку				
50 ^a	2.57 ± 0.18	—	—	—
72 ^a	0.168 ± 0.025	0.302 ± 0.014	0.142 ± 0.019	—
96 ^b	0.305	0.245	0.129	0.092

^a Приведены усредненные данные для 8 доноров. ^b Среднее для 2 доноров.

чение проводили в G₂-фазе цикла. При последующих временах фиксации эти показатели у клеток 1-го митоза существенно ниже (табл. 1).

Было обнаружено также, что в метафазах 2-го митоза при фиксации через 72 ч у лимфоцитов большинства доноров больше aberrантных клеток, чем в метафазах 1-го или 3-го митозов на тот же час фиксации; выше у них также и число aberrаций на клетку (табл. 1).

У подавляющего количества индивидуумов в спектре aberrаций в этот момент присутствуют aberrации хромосомного типа. По-видимому, в данном случае регистрируются клетки, облученные в G₁-фазе после 1-го митоза.

В 3-х митозах на 72-м ч фиксации частота клеток с aberrациями хромосом и число aberrаций на клетку по сравнению со 2-ми митозами снижается у всех обследованных; по сравнению с 1-м митозом в этом случае следует отметить значительную индивидуальную вариабельность. Наблюдаются в основном aberrации хромосомного типа.

К 4-му поколению происходит дальнейшее снижение частоты поврежденных клеток и числа повреждений на клетку, однако их уровень превышает контрольный.

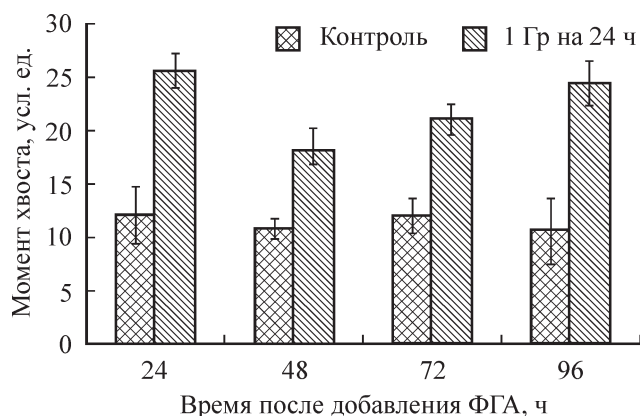


Рис. 1. Степень фрагментации ДНК в необлученных потомках клеток, облученных в дозе 1 Гр через 24 ч после стимуляции ФГА.

Наличие aberrаций хромосом во 2—4-м митозах позволяет предполагать, что у потомков облученных клеток нестабильность генома, возникшая при облучении, реализуется в aberrации хромосом, которые образуются de novo, что было описано ранее нами и многочисленными авторами зарубежных и отечественных работ (Morgan et al., 1996; Пелевина и др., 1998; Little, 2000). Кроме того, часть хромосомных aberrаций может проходить через митоз (Рябченко и др., 2004).

Увеличение числа повреждений в необлученных потомках облученных клеток можно также объяснить и эффектом свидетеля, т. е. влиянием облученных клеток в результате межклеточных контактов с необлученными или действием облученной среды на необлученные клетки. Предполагается, что при этом выделяются активные формы кислорода, перекиси, цитокины и т. д. (Mothersill, Seymour, 2001).

На те же сроки после стимуляции ФГА (24—96 ч) была изучена степень фрагментации ДНК методом ДНК-комет. Клетки облучали через 24 ч после стимуляции в дозе 1 Гр. Затем через 48, 72 и 96 ч определяли степень фрагментации ДНК, обусловленную преимущественно ДР ДНК. Данные приведены на рис. 1, где суммированы результаты четырех независимых экспериментов. Наиболее высокий уровень фрагментации ДНК наблюдается сразу после облучения. Однако в потомках облученных клеток в течение 96 ч отмечается также высокий уровень фрагментации ДНК, он несколько снижается к 48 ч (1-е митозы), но затем даже несколько повышается (преимущественно 2-е и 3-и митозы). По-видимому, и в этом случае наличие ДР ДНК в необлученных потомках облученных клеток можно объяснить теми же механизмами — возникшей нестабильностью генома и эффектом свидетеля. Возможно также, что часть нерепарированных разрывов ДНК проходит S-фазу и митоз. Нельзя исключить и волну вторичной деградации ДНК (72—96 ч) (Афанасьев и др., 1997).

Далее было изучено формирование АО в разных митотических циклах после ФГА-стимуляции и сочетанного адаптирующего и проявляющего облучения.

В 1-м митозе (при фиксации через 50 ч после стимуляции клеток ФГА) радиочувствительность лимфоцитов всех обследованных доноров оказалась ниже, чем при действии одной ударной дозы, — наблюдается адаптивный ответ. Он регистрируется по уменьшению числа клеток с aberrациями хромосом и по числу aberrаций на клетку (табл. 2). Все зарегистрированные на этот час фиксации aberrации хромосом относятся к хроматидному типу.

Изучение способности к адаптивному ответу клеток во 2—4-м митозах после облучения в адаптирующей и проявляющей дозах показало, что при фиксации через 72 ч во 2-м митозе АО наблюдается у подавляющего большинства обследованных (примерно 90%), у одного наблюдается тенденция к формированию АО, но изменение радиочувствительности не достигает статистически значимого уровня ($P = 0.067$). Анализ спектров aberrаций показывает, что в этом случае АО формируется за счет снижения частоты хромосомных aberrаций.

В 3-м после облучения митозе при фиксации через 72 ч наблюдается высокая индивидуальная вариабельность в наличии АО, в большинстве случаев отмечается тенденция к формированию АО, достоверно он был выявлен лишь у 10% индивидуумов и обусловлен изменением числа хромосомных aberrаций.

В 4-м митозе (96 ч после добавления ФГА) также наблюдается лишь тенденция к проявлению АО, но в данном случае результаты были получены только для очень маленькой выборки.

При исследовании АО методом ДНК-комет в необлученных потомках облученных клеток было обнаружено, что АО проявляется непосредственно после облучения в дозе 1 Гр, а также через 72 и 96 ч (24 и 48 ч после повреждающего облучения соответственно). Следует отметить, что степень проявления АО со временем несколько уменьшается (рис. 2).

Через 72 ч после стимуляции ФГА в популяции преобладают 2-е митозы (52 %; однако примерно 32 % клеток находятся в 1-м митозе и примерно 15 % — в 3-м); через 96 ч до 50 % клеток находятся в 3-м митозе, но значительная часть клеток — в 1-м и 2-м (примерно 10—14 % и примерно 20 % соответственно). Наблюдается высокая индивидуальная вариабельность, но во всех случаях на сроки 72 и 96 ч регистрируются преимущественно необлученные потомки облученных клеток, т. е. можно полагать, что АО, индуцированный ранее, проявляется в течение по крайней мере двух поколений по критерию уменьшения фрагментации ДНК и aberrаций хромосомного типа.

Обращает на себя внимание совпадение результатов при определении нестабильных aberrаций хромосом и фрагментации ДНК (двунитевые разрывы ДНК). После облучения в дозе 1 Гр (48 ч после стимуляции ФГА, фаза G₂ клеточного цикла) в последующих митотических циклах отмечаются повышенный уровень сначала хроматидных, далее со временем (72 и 96 ч) в основном хромосомных aberrаций и увеличенное число ДР ДНК. Речь не идет о полностью аналогичном поведении поврежденных хромосомного аппарата и поврежденности ДНК со временем после облучения, но можно говорить о проявлении нестабильности генома в потомках облученных клеток по этим двум параметрам. Кроме того, можно также предполагать, что повреждения ДНК (двунитевые разрывы) могут служить сигналом (триггером) для повышения радиорезистентности клеток (адаптивного ответа).

Следует отметить, что при определении однонитевых разрывов ДНК и хромосомных aberrаций при облучении в других фазах клеточного цикла (G₁-G₂) такого совпадения поврежденности ДНК и aberrаций хромосом не наблюдается (Wojcik et al., 1996b).

Аналогичная ситуация отмечается при анализе АО. Его частота высока во 2-м митозах (72 ч), но в 3-м и 4-м митозах (72 и 96 ч после стимуляции) формируется лишь тенденция к АО. В то же время по уменьшению уровня двунитевых разрывов АО отмечается через 72 ч, через 96 ч различия недостоверны, наблюдается лишь тенденция к его проявлению.

Обсуждение

Вопрос о механизмах реализации адаптивного ответа в разных поколениях клеток заслуживает отдельного рассмотрения. В настоящее время можно высказать только некоторые соображения. Коротко подытоживая, можно наблюдать такую картину. Адаптивный ответ, определяемый в 1-м митозе (фиксация через 50 ч), обусловлен уменьшением хроматидных aberrаций у лимфоцитов всех доноров. При фиксации через 72 ч в клетках 2-го митоза у всех доноров проявляется адаптивный ответ,

Таблица 2

Способность к адаптивному ответу лимфоцитов крови человека в разных митотических циклах

Время фиксации, ч	Номер митоза	Доза облучения, Гр	Доля клеток с aberrациями, %	Число aberrаций на клетку
50	1-й	1	79.5 ± 2.1	2.57 ± 0.18
		0.05 + 1.00	64.2 ± 2.6 ^a	1.46 ± 0.11 ^a
72	2-й	1	25.3 ± 0.9	0.302 ± 0.014
		0.05 + 1.00	12.8 ± 0.3 ^a	0.144 ± 0.001 ^a
96	3-й	1	11.1	0.129
		0.05 + 1.00	8.2	0.097
96	4-й	1	9.24	0.092
		0.05 + 1.00	6.0	0.067

^a P < 0.001. Облучение в адаптирующей дозе 0.05 Гр проводили через 24 ч, в проявляющей — через 48 ч после стимуляции ФГА. Демеколлин добавляли за 2 ч до фиксации. Приведены средние данные по 8 донорам.

спектр aberrаций в них представлен в основном aberrациями хромосомного типа.

Методом ДНК-комет также обнаружено на этот срок существенное снижение уровня ДР ДНК после адаптирующего облучения. Можно предположить, что это «быстрые» клетки, получившие проявляющее облучение в G₁-фазе цикла после 1-го митоза.

Полученные экспериментальные данные показывают, что не наблюдается общих закономерностей в разных митотических циклах (1—4-й митозы) после облучения клеток в адаптирующей дозе через 24 ч после стимуляции ФГА и ударной через 48 ч. Высокая частота формирования АО обнаружена только в 1-м (50 ч) и во 2-м митозах (72 ч после стимуляции) по показателю снижение aberrаций хроматидного и хромосомного типа соответственно. Однако уже в 3-м и 4-м митозах наблюдается лишь тенденция к АО. В первом случае АО обусловлен уменьшением числа хроматидных aberrаций. Во втором случае уменьшается число хромосомных aberrаций или возможно, что АО обусловлен и гибелью поврежденных клеток во время митоза. Аналогичная картина отмечается при анализе проявления АО в потомках облученных клеток

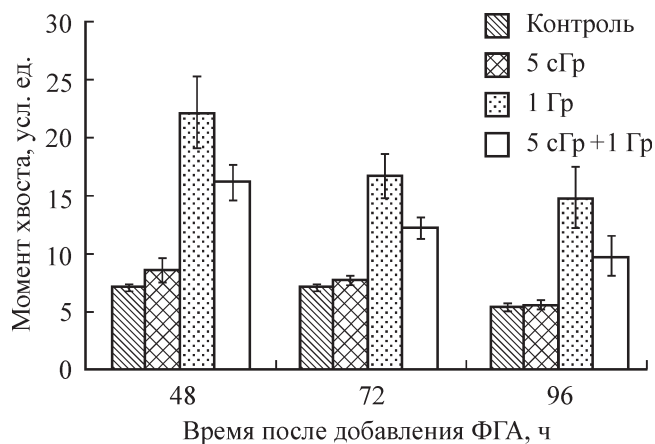


Рис. 2. Изменение уровня фрагментации ДНК клеток, облученных в адаптирующей дозе 5 cГр через 24 ч и в проявляющей дозе 1 Гр через 48 ч после стимуляции ФГА.

методом ДНК-комет. Это может свидетельствовать о том, что при данной схеме эксперимента при облучении клеток в G₁-G₂ фазах цикла (24 и 48 ч после стимуляции ФГА) длительность проявления АО невелика (до 3-го митоза). Кроме того, подтверждаются данные о том, что АО может формироваться за счет aberrаций хроматидного и хромосомного типов, за счет уменьшения числа ДР ДНК, но наиболее высока степень проявления АО по aberrациям хроматидного типа при облучении клеток в ударной дозе в фазе G₂ клеточного цикла. Фаза эта самая короткая по времени, и при исследовании радиоиндуцированного АО на уровне организма, при высокой неоднородности популяции можно предположить, что только малая часть клеток будет формировать АО за счет хроматидных aberrаций.

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

Список литературы

- Афанасьев Г. Г., Иваненко Т., Крушевский М., Пелевина И. И. 1997. Повреждения ДНК, их репарация и апоптоз в отдаленных поколениях клеток L5178Y(R) после радиационного воздействия (метод ДНК-комет). Цитология. 39 (8) : 740—746.
- Куликов Н. В., Альшиц Л. К., Позолотин А. А., Ташевская С. В. 1971. Изменения радиочувствительности растений как результат предварительного облучения. Радиобиология. 11 (4) : 630—632.
- Лакин Г. Ф. 1973. Биометрия. М.: Высшая школа. 343 с.
- Пелевина И. И., Алещенко А. В., Антошина М. М., Рябченко Н. И., Семенова Л. П., Серебряный А. М. 2007а. Индивидуальная вариабельность в проявлении адаптивного ответа клеток человека на воздействие ионизирующей радиации. Подходы к ее определению. Радиационная биология. Радиозэкология. 47 (6) : 658—666.
- Пелевина И. И., Антошина М. М., Бондаренко В. А., Воробьева Н. Ю., Воронков Ю. И., Готлиб В. Я., Кудряшова О. В., Осипов А. Н., Рябченко Н. И., Серебряный А. М., Цетлин В. В. 2007б. Индивидуальные цитогенетические и молекулярно-биологические особенности лимфоцитов крови летчиков и космонавтов. Радиационная биология. Радиозэкология. 47 (2) : 141—150.
- Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Алещенко А. В., Готлиб В. Я., Курнешева Л. Е., Носкин В. А., Носкин Л. А., Семенова Л. П., Серебряный А. М. 1999. Радиоиндуцированный адаптивный ответ у детей и влияние на него внешних и внутренних факторов. Радиационная биология. Радиозэкология. 39 (1) : 106—112.
- Пелевина И. И., Готлиб В. Я., Кудряшова О. В., Антошина М. М., Серебряный А. М. 1998. Свойства потомков облученных клеток. Цитология. 40 (5) : 467—477.
- Рябченко Н. И., Антошина М. М., Насонова В. А., Фесенко Э. В., Готлиб В. Я. 2004. Aberrация хромосом в лимфоцитах человека при различной продолжительности культивирования после облучения. Радиационная биология. Радиозэкология. 44 (2) : 146—150.
- Севаньяев А. В. 1987. Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле. М.: Энергоиздат. 159 с.
- Серебряный А. М., Антошина М. М., Алещенко А. В., Рябченко Н. И., Пелевина И. И. 2008. О механизме адаптивного ответа. Оценка способности лимфоцитов крови человека к радиационному адаптивному ответу с помощью разных критериев. Цитология. 50 (5) : 461—465.
- Ahmed K. M., Li J. J. 2008. NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. Free Radic. Biol. Med. 44 : 1—13.
- Bosi A., Olivieri G. 1989. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. Mutat. Res. 211 : 13—17.
- Bravard A., Petridis F., Luccioni C. 1999. Modulation of antioxidant enzymes p21WAF1 and p53 expression during proliferation and differentiation of human melanoma cell lines. Free Radic. Biol. Med. 26 : 1027—1033.
- Coates P. J., Lorimore S. A., Wright E. G. 2004. Damaging and protective cell signalling in the untargeted effects of ionizing radiation. Mutat. Res. 568 : 5—20.
- Coleman M. A., Yin E., Peterson L. E., Nelson D., Sorensen K., Tucker J. D., Wyrobek A. J. 2005. Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response. Radiat. Res. 164 : 369—382.
- Cramers P., Atanasova P., Vrolijk H., Darroudi F., van Zee-land A. A., Huiskamp R., Mullenders L. H. F., Kleijns C. S. 2005. Pre-exposure to low doses: modulation of X-ray-induced DNA damage and repair. Radiat. Res. 164 : 383—390.
- Hain J., Jaussi R., Burkart W. 1992. Lack of adaptive responses to low doses of ionizing radiation in human lymphocytes from five different donors. Mutat. Res. 283 : 137—144.
- Iyer R., Lehnert B. E. 2002a. Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. Mutat. Res. 503 : 1—9.
- Iyer R., Lehnert B. E. 2002b. Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. Radiat. Res. 157 : 3—7.
- Jiang H., Li W., Li X., Cai L., Wang G. 2008. Low-dose radiation induces adaptive response in normal cells, but not in tumor cells: *in vitro* and *in vivo* studies. J. Radiat. Res. (Tokyo). 49 : 219—230.
- Kalina I., Némethová G. 1997. Variability of the adaptive response to low dose radiation in peripheral blood lymphocytes of twins and unrelated donors. Folia Biol. (Praha). 43 : 91—95.
- Little J. B. 2000. Radiation carcinogenesis. Carcinogenesis. 21 : 397—404.
- Matsumoto H., Ohnishi T. 2004. Contribution of radiation-induced, nitric oxide-mediated bystander effect to radiation-induced adaptive response. Biol. Sci. Space. 18 : 108—109.
- Morgan W. F., Day J. P., Kaplan M. I., McGhee E. M., Limoli C. L. 1996. Genomic instability induced by ionizing radiation. Radiat. Res. 146 : 247—258.
- Mothersill C., Seymour C. 2001. Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. Radiat. Res. 155 : 759—767.
- Mothersill C., Seymour C. 2004. Radiation-induced bystander effects — implications for cancer. Nat. Rev. Cancer. 4 : 158—164.
- Ryabchenko N. I., Antoshchina M. M., Fesenko E. V., Ivanova T. I., Kondrashova T. V., Nasonova V. A. 1998. Cytogenetic adaptive response in cultured human lymphocytes: dependence on the time of exposure to adapting and challenging doses of gamma-rays. Mutat. Res. 418 : 7—19.
- Salone B., Pretazzoli V., Bosi A., Olivieri G. 1996. Interaction of low-dose irradiation with subsequent mutagenic treatment: role of mitotic delay. Mutat. Res. 358 : 155—160.
- Samson L., Cairns J. 1977. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. Nature. 267 : 281—283.
- Shadley J. D., Afzal V., Wolff S. 1987. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X-rays to human lymphocytes. Radiat. Res. 111 : 511—517.
- Shadley J. D., Wiencke J. K. 1989. Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. Int. J. Radiat. Biol. 56 : 107—118.
- Sorensen K. J., Attix C. M., Christian A. T., Wyrobek A. J., Tucker J. D. 2002. Adaptive response induction and variation in human lymphoblastoid cell lines. Mutat. Res. 519 : 15—24.
- Tapio S., Jacob V. 2007. Radioadaptive response revisited. Radiat. Environ. Biophys. 46 : 1—12.
- Wiencke J. K., Afzal V., Olivieri G., Wolff S. 1986. Evidence that the [3H]thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. Mutagenesis. 1 : 375—380.

Wojcik A., Aghamohammadis S., Aillaud M., Bosi A., Dai G., Olivieri G., Salone B., Savage J. R., Shadley J. D., Streffer C. 1996a. Adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes: the problem of scoring aberrations in cells irradiated during asynchronous growth. *Mutat. Res.* 366 : 137—143.

Wojcik A., Sauer K., Zolzer F., Bauch Th., Muller W.-U. 1996b. Analysis of DNA damage recovery processes in the adapti-

ve response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis.* 1 : 291—297.

Zhang L. 1995. Cytogenetic adaptive response induced by pre-exposure in human lymphocytes and marrow cells of mice. *Mutat. Res.* 334 : 33—37.

Поступила 26 V 2008

ADAPTIVE RESPONSE IN THE DIFFERENT MITOTIC CYCLES AFTER IRRADIATION

I. I. Pelevina,^{1,*} A. V. Aleschenko,² M. M. Antoschina,³ O. V. Boeva,¹ V. J. Gotlib,¹ O. V. Kudriashova,¹
E. Yu. Lizunova,¹ A. N. Osipov,¹ N. I. Ryabchenko,³ L. P. Semenova,² A. M. Serebryanyi²

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

* e-mail: pele@chph.ras.ru

The frequency of cells with chromosome aberrations and the number of aberrations per cell by metaphase analysis have been studied in the nonirradiated progeny of irradiated human blood lymphocytes. The DNA fragmentation (DNA double strand breaks) have simultaneously been investigated by the DNA comet assay. PHA stimulated lymphocytes have been irradiated in the adaptive dose 0.05 Gy 24 h and in the challenge dose 1 Gy 48 h after stimulation to study the adaptive response (AR). 5-bromodeoxyuridine have been added for the identification the first—the fourth mitoses. It has been discovered that the frequency of chromosome aberrations is increased in all mitotic cycles after challenge irradiation, the level of double strand breaks is increased too. The adaptive response is induced by the adaptive and challenge irradiation in the first and the second mitotic cycles (fixation 48 and 72 h after stimulation) for the most parts of individuals, but it is absent in the third and the fourth mitosis. Only chromatid aberrations are observed in the first mitosis, but chromosome aberrations — in the following mitosis. Investigation by the DNA comet assay have showed the adaptive response is noticed 48—72 h after stimulation but it is insignificant 96 h. The conclusion is that the genomic instability is observed in nonirradiated progeny irradiated lymphocytes; the adaptive response is manifested up to third mitosis and is explained by the decreasing of the number of the chromatid and chromosome aberrations and DNA fragmentation. We can suppose that double strand DNA breaks can be signaling damage for the adaptive response induction.

Key words: adaptive response, chromosome aberrations, human blood lymphocytes, DNA comet assay, genomic instability, DNA fragmentation.