

О МНОЖЕСТВЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ РАДИАЦИОННОГО АДАПТИВНОГО ОТВЕТА У ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© A. M. Серебряный

*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва;
электронный адрес: amserabr@gmail.com*

В обзоре обобщены результаты исследований феномена, который известен под названием адаптивный ответ (АО) и заключается в уменьшении радиочувствительности клеток после воздействия различных повреждающих факторов в малых дозах. АО описан для множества биологических объектов. Настоящая работа посвящена АО лимфоцитов периферической крови человека. Особенностью АО лимфоцитов является реализация всего каскада событий, повышающих радиорезистентность, на протяжении одного митотического цикла в отличие от феномена адаптации клеток к хроническому облучению в малой дозе. Основное внимание в обзоре удалено исследованиям, посвященным инициирующим стадиям формирования АО, возникающего как следствие неспецифических внутриклеточных изменений, которые сигнализируют о нарушении гомеостаза клетки и расцениваются рядом исследователей как состояние стресса. После перехода в это состояние в клетке протекают биохимические процессы, повышающие ее устойчивость к последующему воздействию повреждающего фактора (в том числе и радиации) в большой дозе. Эти процессы не детерминируются строго первичным стимулом и не инициируются непосредственно действием внешнего индуцирующего АО фактора. Конкретный способ повышения радиорезистентности зависит от генотипа клетки, условий проведения эксперимента и т. д. Это могут быть синтез репарационных ферментов разного типа, ферментов антиоксидантной защиты и активизация процессов деления клеток или апоптоза. Клетки, не перешедшие в состояние стресса, АО не формируют. Если за фазой перехода в состояние стресса не следует значительное по интенсивности воздействие повреждающего фактора, то через некоторое время клетка переходит в нормальное состояние и способность к АО исчезает.

Ключевые слова: лимфоциты крови человека, адаптивный ответ, стресс-реакция клетки, репарация ДНК, антиоксидантные системы, апоптоз, популяционный сдвиг.

Принятые сокращения: АО — адаптивный ответ, ФГА — фитогемагглютинин, МННГ — N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин.

В 1984 г. Оливиери и соавторы (Olivieri et al., 1984) показали, что частота aberrаций хроматидного типа, индуцированная облучением в высокой дозе, у лимфоцитов периферической крови человека оказывается ниже, если перед облучением в высокой дозе клетки культивируют в среде, содержащей радиоактивный тимицин, или облучают в малой дозе. Феномен был назван адаптивным ответом (АО). Принципиально важно, что весь каскад событий, приводящих к повышению радиорезистентности, протекает за относительно короткий промежуток времени, охватывающий период от стимуляции клеток к делению и облучения клеток в малой дозе до первого митотического деления, т. е. на протяжении всего одного митотического цикла. Это свойство отличает АО от феномена адаптации клеток к хроническому облучению в малой дозе и вообще от известного процесса адаптации организма к изменившимся условиям окружающей среды и позволяет предполагать функционирование иных механизмов формирования.

Феномен АО сразу привлек внимание и стал объектом всестороннего изучения, так как его исследование да-

вало надежду на открытие новых сторон действия малых доз радиации, новых аспектов механизмов поддержания гомеостаза клетки, новых механизмов защиты ее от внешних воздействий и т. д.

Детальный анализ результатов даже части опубликованных работ с использованием различных объектов является серьезной задачей. С момента открытия АО данному феномену и возможным механизмам его формирования посвящено множество статей, поэтому в настоящей работе мы ограничимся в основном анализом результатов исследований, выполненных только на одном объекте — культуре лимфоцитов периферической крови человека — с использованием таких цитогенетических показателей, как частота клеток с aberrациями хромосом или с микроядрами. В ограниченном объеме будут обсуждены также результаты исследования АО у родственных объектов, например культуры лимфобластоидных клеток ТК6.

Целью настоящего обзора являются, во-первых, изложение экспериментальных фактов как об инициирующих стадиях формирования АО, так и о его последующих стадиях и, во-вторых, доказательство существования не

одного, а нескольких механизмов его формирования. В итоге мы хотели бы показать, что даже для одного биологического объекта существует большое число возможностей и путей формирования АО, при этом невозможно предсказать, какой путь будет реализован в условиях конкретного эксперимента. С нашей точки зрения, подробный анализ механизмов АО у лимфоцитов человека может оказаться полезным и для понимания механизмов АО у других объектов.

Как известно, для цитологических исследований используют стимулированные к митотическому делению лимфоциты периферической крови. Но известны попытки оценить возможность формирования АО после облучения в малой дозе и у нестимулированных лимфоцитов (Cramers et al., 2005). В данной работе была использована методика преждевременной конденсации хромосом. Авторы обнаружили, что адаптирующее облучение Х-лучами в дозе 10 сГр снижает эффект последующего облучения (через 4 ч) клеток в дозе 4 или 6 Гр, что проявлялось в уменьшении показателя частоты разрывов хромосом. Анализ степени повреждения генома лимфоцитов показал, что предварительное адаптирующее облучение клеток снижает эффект последующего проявляющего облучения на количество однонитевых и двухнитевых разрывов ДНК, но не влияет на скорость reparации этих повреждений. Поэтому авторы полагают, что механизм формирования АО у неделяющихся лимфоцитов не связан с изменениями в reparации первичных повреждений ДНК.

Главная трудность в изучении механизмов АО у стимулированных лимфоцитов человека связана со сложным составом их популяции, состоящей после стимуляции как из клеток, не вступивших в клеточный цикл, так и из клеток, движущихся по клеточному циклу асинхронно, с разной скоростью. Соотношение между этими фракциями клеток различно в культурах, полученных от разных доноров. Облучению как в адаптирующей, так и проявляющей дозе подвергаются клетки, находящиеся в разных фазах клеточного цикла. В итоге возникает сложный набор из aberrаций хроматидного и хромосомного типов, «состав» которого зависит как от времени, прошедшего с момента стимуляции клеток до облучения в проявляющей дозе, так и от времени между облучением в проявляющей дозе и фиксацией клеток. В итоге неудивительно, что существует неопределенность в констатации самого факта, способна ли конкретная популяция лимфоцитов к формированию АО или нет. Например, по данным метафазного анализа, у одной и той же популяции лимфоцитов, облученной в адаптирующей дозе через 54 ч после стимуляции, а в проявляющей — 10 ч спустя, АО регистрируется только у клеток, фиксированных в один из трех различных сроков фиксации, и не выявляется у клеток, фиксированных в другие сроки (Wojcik et al., 1996a).

Вероятность наблюдения АО по результатам метафазного анализа частоты aberrаций хромосом (в основном хроматидного типа) зависит от фазы клеточного цикла, в которой проводится адаптирующее или проявляющее облучение. Адаптирующее облучение можно проводить в разные периоды клеточного цикла — до стимуляции деления лимфоцитов с помощью фитогемагглютинина (ФГА) (Cai, Liu, 1990; Khandogina et al., 1991; Ryabchenko et al., 1998), вскоре после стимуляции (G_1) (Olivieri et al., 1984; Cai, Liu, 1990; Khandogina et al., 1991), в фазе S (Cai, Liu, 1990; Khandogina et al., 1991) и даже в фазе G_2 (Cai, Liu, 1990). Однако момент использования

проявляющего (ударного) облучения является критическим.

Имеется сообщение о том, что если оба облучения происходят до стимуляции ФГА, то АО не возникает (Wang et al., 1991). Во всех случаях, когда проявляющее облучение проводили в фазе G_2 (48—51 ч после стимуляции), имел место АО (Olivieri et al., 1984; Cai, Liu, 1990; Ryabchenko et al., 1998), причем об отрицательных результатах в этом случае сообщений нет. Однако о последствиях ударного облучения в фазе G_1 нет однозначного мнения. Шадли и Дай (Shadley, Dai, 1992) наблюдали АО лимфоцитов при облучении по схеме G_1 — G_1 адаптирующее облучение 5 сГр через 12 ч после стимуляции и ударное — через 18 ч после ФГА. С результатами этого исследования согласуются и данные других авторов (Wang et al., 1991), которые показали, что АО может возникать при облучении лимфоцитов по схеме G_1 — G_1 и что наилучшие результаты наблюдаются в случае интервала между двумя облучениями, равного 5 ч. Напротив, в других исследованиях (Khandogina et al., 1991; Wojcik et al., 1996b) не наблюдали возникновения АО после ударного облучения в фазе G_1 . Рябченко и соавтор. (Ryabchenko et al., 1998) показали, что АО может возникать как при облучении по схеме G_1 — G_1 , так и при облучении по схеме G_1 — G_2 , но в последнем случае существенно чаще: в первом варианте АО наблюдали у лимфоцитов 2 доноров из 7, во втором — у 11 из 15.

Иные результаты наблюдаются в работах с использованием микроядерного теста. Известно, что микроядра, фиксируемые в этом тесте как повреждения генома, возникают в результате хромосомных aberrаций и других крупных повреждений хромосом (Kirsch-Volders et al., 2003), в то время как метафазный анализ позволяет выявить aberrации как хромосомного, так и хроматидного типа. Вероятно, это различие и объясняет часто наблюдавшую разницу результатов, полученных при изучении АО этими методами. Систематических исследований этой проблемы проведено не было. Наш опыт показывает, что частота обнаружения АО у лимфоцитов, полученных от разных доноров, с помощью микроядерного теста практически не зависит от схемы опыта (Пелевина и др., 2012). Данные показатели практически одинаковы как при облучении лимфоцитов в адаптирующей и проявляющей дозах на стадии G_1 , так и при использовании схемы G_1 — G_2 соответственно.

Особенности упомянутых выше методик, по-видимому, позволяют объяснить тот факт, что данные о наличии или отсутствии АО, полученные с помощью метафазного анализа и микроядерного теста с цитохалазином В, как правило, не совпадают (Пелевина и др., 2007; Серебряный и др., 2008a). Например, в одной из работ (адаптирующее облучение в дозе 5 сГр через 24 ч после стимуляции, проявляющее — 1 Гр через 48 ч после стимуляции) были исследованы лимфоциты 8 доноров. По данным метафазного анализа (фиксация через 50 ч после стимуляции), лимфоциты всех 8 доноров способны к АО, в то время как микроядерный тест выявил способность к АО лишь у лимфоцитов 2 доноров. В то же время в литературе имеются данные о полном совпадении результатов оценки способности лимфоцитов к АО, полученных при использовании этих двух методов (Vijayalakshmi et al., 1995).

О сложности феномена АО свидетельствуют также данные о том, что АО не только отсутствует у лимфоцитов некоторых доноров, но иногда вместо АО наблюдает-

ся обратный эффект — повышение радиочувствительности, которое чаще обнаруживается при использовании микроядерного теста. Так, если факт повышения радиочувствительности лимфоцитов после адаптирующего облучения отмечен только в одной работе, проведенной с использованием метафазного метода (Bosi, Olivieri, 1989), то при использовании микроядерного теста с цитохалазином В подобные лимфоциты обнаруживаются во всех исследованных нами выборках (Пелевина и др., 2000, 2012).

Принципиальный вопрос — величины доз облучения, вызывающих радиационный АО. Было установлено, что адаптирующая доза не может быть слишком малой. Так, облучение лимфоцитов человека γ -лучами в дозе 0.5 сГр не вызывает АО, но АО наблюдается после адаптирующей дозы 1 сГр. Облучение клеток двумя дозами по 0.5 сГр суммируется и вызывает аналогичный АО, как и доза 1 сГр, если облучение происходит в одном митотическом цикле, но эффект от двойного облучения по 1 сГр не суммируется (Fan et al., 1990; Bai, Chen, 1993). Считается, что верхняя граница доз, вызывающих АО у лимфоцитов человека, равна 10 (Sorensen et al., 2002) или 20 (Matsumoto et al., 2007) сГр.

Накопленные данные показывают, насколько вариабелен АО у лимфоцитов человека, в результате чего наблюдаемые результаты могут значительно различаться в зависимости от условий облучения, времени фиксации и т. п. Эта вариабельность проявлений, по-видимому, может быть причиной некоторых противоречий в объяснении его механизма.

События, инициирующие возникновение адаптивного ответа

Как у всякого процесса, у АО есть инициирующая стадия, есть стадии формирования, есть и стадия фиксации. В качестве основного кандидата на роль процесса, инициирующего и формирующего АО, сразу стали рассматривать процесс репарации повреждений ДНК. Данное предположение опиралось на два факта. Во-первых, у бактерий адаптивный ответ к действию алкилирующего агента происходит вследствие индукции специфического фермента,участвующего в репарации поврежденных сайтов (Kartan et al., 1979), и, во-вторых, аминобензамид (ингибитор полиривоаденозилирования) ингибирует радиационный АО у лимфоцитов человека (Shadley, Wolff, 1987). Предполагалось, что инициирующими (первичными) событиями, дающими импульс к изменению внутриклеточных процессов после облучения лимфоцитов в малой дозе и в конечном счете приводящими к уменьшению радиочувствительности, являются возникновение повреждений ДНК и индукция вследствие этого универсальной репарационной системы, обеспечивающей повышение устойчивости клетки к последующему облучению в большой дозе.

Было выдвинуто также и альтернативное предположение о том, что адаптирующее облучение не индуцирует синтез новых репаративных ферментов, а изменяет динамику движения клеток по клеточному циклу, увеличивает продолжительность клеточного цикла, обеспечивая тем самым большее время для более полной и эффективной репарации повреждений ДНК (Wolff, 1996). Предпринимались неоднократные попытки проверки этой гипотезы, однако она не получила экспериментального под-

тверждения (Aghamohammadi, Savage, 1991; Salone et al., 1996; Wolff, 1998; Varès et al., 2011).

К настоящему времени опубликовано огромное число работ, посвященных механизму формирования АО, однако большинство авторов отмечают, что в целом этот механизм остается неизвестным, несмотря на выяснение многих его аспектов.

В любом случае не подлежит сомнению, что возникновение повреждений ДНК и индукция ферментов репарации не могут быть единственными инициирующими событиями, начинаящими цепь процессов, приводящих к формированию АО (Серебряный, 2011). Набор адаптирующих воздействий, вызывающих снижение радиочувствительности лимфоцитов, чрезвычайно широк и включает в себя как радиационные воздействия разного типа и радиомиметики, так и вещества, вызывающие повреждение ДНК принципиально иного типа, и даже факторы, вообще не повреждающие ДНК. Данные, полученные в последние годы, подтверждают эти соображения. Так, в публикации Ямамото и соавторов (Yamamoto et al., 2011) показано, что радиочувствительность лимфобластоидных клеток человека ТКБ может быть снижена предварительной обработкой их МНГ — мутагеном, вызывающим принципиально иные, чем радиация, повреждения ДНК. Еще более парадоксален результат другой работы, авторы которой описывают феномен снижения радиочувствительности лимфоцитов крови человека, вызванный облучением клеток неионизирующим электромагнитным облучением с частотой 1950 МГц, неспособным повреждать ДНК (Sannino et al., 2014). Маловероятно, что столь разнообразный набор воздействий может индуцировать универсальную репаративную систему, функционирование которой обеспечивает повышение радиостойчивости клеток.

Гипотеза об индукции каких-либо систем репарации при облучении лимфоцитов в адаптирующих дозах была однозначно отвергнута после изучения экспрессии генов стимулированных лимфоцитов с использованием метода кДНК-микрочипа (cDNA microarray), позволяющего одновременно оценивать экспрессию многих (до нескольких тысяч) генов. Была исследована экспрессия генов у лимфоцитов, облученных *in vitro* на стадии G₀ гамма-лучами в дозах 10, 25 и 50 сГр (Fachin et al., 2007). Затем клетки стимулировали ФГА и через 48 ч после стимуляции изучали изменения в экспрессии 4500 генов. Выбор времени и дозы облучения позволил проанализировать экспрессию генов в экспериментальных условиях, в которых возникает АО и в которых его обычно не наблюдают. Так, ранее было показано, что облучение в малой дозе клеток на стадии G₀ клеточного цикла приводит к адаптивному ответу (Cai, Liu, 1990; Khandogina et al., 1991; Ryabchenko et al., 1998). Считается также, что радиационный АО у лимфоцитов индуцируется дозами меньше 10 сГр и не индуцируется дозами 25 и тем более 50 сГр. Выбор момента времени для изучения активности генов определялся тем, что именно в этот момент в большей части исследований АО лимфоцитов проводится облучение клеток в проявляющей дозе.

Было установлено, что число генов, активность которых изменяется, возрастает с увеличением дозы облучения. Облучение в дозе 10 сГр приводит к изменению активности 86 генов, причем активность 25 из них изменяется только при облучении в дозе 10 сГр и не изменяется при облучении в других дозах. В обсуждаемой работе авторы приводят данные о биологических функциях и на-

правлении изменения активности после облучения в дозе 10 сГр для 11 из этих 25 генов. Следует обратить внимание, что среди этих 11 генов отсутствуют гены систем репарации или систем антиоксидантной защиты, т. е. систем, с которыми в первую очередь связаны попытки объяснения механизма адаптивного ответа. Более того, из этих 11 генов активируются только 3 — ген *CYP4X1*, из семейства генов цитохрома P450, ген *ATF6* трансмембранный гликопротеина эндоплазматического ретикулума и ген *FLJ16517/LIN28B* контроля клеточного цикла. Остальные гены, для которых показано изменение активности, репрессируются (Fachin et al., 2007).

Авторы также приводят список 68 генов из тех 86, активность которых меняется после облучения в дозе 10 сГр. Согласно базе данных PubMed, среди этих 68 генов продукт только 1 гена (*XAB2*) имеет отношение к процессам репарации ДНК, но он не активируется, а репрессируется.

Похожие результаты при использовании того же метода были получены при изучении изменений глобальной экспрессии генов, вызываемых облучением в дозе 2 сГр или 4 Гр, у близкого объекта — нормальных фибробластов кожи человека (Ding et al., 2005). Авторы выявили качественные и количественные различия профилей экспрессии генов после облучения в этих дозах. Идентифицировано 16 генов, экспрессия которых изменяется (как усиливается, так и подавляется) только при облучении в дозе 2 сГр, но не после облучения в дозе 4 Гр. Продукты этих генов участвуют в процессах межклеточной коммуникации, пролиферации клеток, преобразования (transduction) сигналов и регуляции транскрипции. Существенно, что облучение в дозе 2 сГр не изменяет экспрессию кластера генов, связанных с апоптозом, а также гена *Tp53* и связанных с ним генов. Не обнаружено также достоверного изменения экспрессии генов, непосредственно связанных с репарацией повреждений ДНК, после облучения клеток кожи человека в дозе 10 сГр (Berglund et al., 2008).

К этим работам примыкает исследование изменений экспрессии мРНК ряда генов, связанных с реакцией гено-ма на облучение (Saini et al., 2012). Лимфоциты в фазе G₀ облучали в дозах от 10 сГр до 2 Гр и через 1 и 5 ч изучали изменения экспрессии генов *ATM*, *ATR*, *GADD45A*, *CDKN1A*, *Tp53*, *CDK2*, *MDM2* и *Cyclin E*. К сожалению, результаты исследования представлены не в численном виде, а в виде гистограмм, что не позволяет строго оценить, есть ли различия в экспрессии генов после облучения в дозе 10 сГр по сравнению с контролем. Из представленных графических данных следует, что через 1 ч после облучения в дозе 10 сГр не выявлено изменений экспрессии генов *ATR*, *MDM2*, *CDK2* и *CDKN1A*, наблюдаются снижение экспрессии гена *GADD45A* и усиление экспрессии гена *Cyclin E*. Изменения экспрессии генов *ATM* и *Tp53* сложно оценить однозначно. Таким образом, из результатов этой работы следует, что даже при облучении лимфоцитов в дозе вдвое большей, чем обычно используется при изучении АО, не наблюдается принципиальных изменений экспрессии генов, принимающих участие в репарации ДНК, но отмечается активация синтеза циклина Е — фермента, участвующего в регуляции клеточного цикла эукариот.

Таким образом, результаты изучения изменений активности генов не согласуются с идеей о том, что возникновение повреждений ДНК и индукция ферментов репарации являются инициальными событиями, начинающими цепь процессов, приводящих к формированию АО.

В последние годы также сформировался иной взгляд на природу процессов, инициирующих формирование АО. Начало этому направлению положили работы, показавшие, что ингибиование синтеза митогенактивируемой протеинкиназы p38 или протеинкиназы С предотвращает формирование АО в перевиваемых культурах клеток мыши и нормальных диплоидных клетках человека (Shimizu et al., 1999; Suzuki et al., 2001). Проведенные затем исследования позволили показать, что изменения активности стрессактивируемых протеинкиназ являются основными инициирующими событиями, приводящими к АО. Согласно одной из схем внутриклеточной передачи сигналов в облученной клетке (Szumiel, 2005), инициирующими событиями, приводящими в итоге к АО, кроме повреждений ДНК могут быть также изменения активности киназ, связанных с мембранами. Примечательно, что, согласно этой схеме, арест клеточного цикла и апоптоз не являются факторами, приводящими к АО. В литературе имеются указания на возможную роль образующихся при облучении клеток в адаптирующей дозе активных форм кислорода как самых первых сигнальных молекул, активирующих сигнальные сети в клетке (Miura, 2004). Имеются также данные об активизации синтеза циклинов Е и D1, участвующих в регуляции клеточного цикла эукариот, в лимфоцитах и кератиноцитах человека после облучения в малой дозе (Ahmed et al., 2008; Saini et al., 2012).

Таким образом, создается впечатление, что первичным событием, начинающим цепь превращений, реализующихся в конце концов в виде АО, является нарушение гомеостаза клетки. С учетом всего разнообразия факторов, способных в малой дозе вызывать повышение радиорезистентности лимфоцитов (см. выше), известно, что природа нарушения гомеостаза не играет определяющей роли. Но остается открытым вопрос о том, каким образом сигналы о нарушении гомеостаза реализуются в изменениях эффективности работы ферментных систем, обеспечивающих устойчивость клетки при последующих «сильных» воздействиях.

Процессы, формирующие адаптивный ответ

По мнению Сасаки и соавторов (Sasaki et al., 2002), первичным сигналом, начинающим цепь событий, приводящих к АО, является возникновение двухнитевых разрывов ДНК. Это событие приводит к последовательной активации следующих белков сигнального пути — протеинкиназы С — митогенактивируемая протеинкиназа p38 — белок p53. По мнению авторов, белок p53 играет ключевую роль в формировании АО и изменениях эффективности репарации двухнитевых разрывов ДНК. Подробно исследования, посвященные роли белка p53 в формировании АО, мы обсудим ниже в связи с возможной ролью апоптоза в этом процессе.

В ряде публикаций можно найти частичные сведения о системах, формирующих АО. В одной из работ проанализированы изменения экспрессии приблизительно 12 500 генов у трех линий лимфобластоидных клеток человека, две из которых способны к АО, а одна — нет (Coleman et al., 2005). Авторы сравнивали изменения экспрессии генов после облучения клеток в дозе 2 Гр с изменениями после сочетанного облучения в дозе 5 сГр + 2 Гр. Таким образом, анализ производили после завершения формирования АО. Было обнаружено, что только у линий, способных к АО, активируются как гены контроля

клеточного цикла и передачи сигналов, ответа на стрессовые воздействия, так и гены, вовлеченные в процессы репарации ДНК (например, *ATM*). Результаты этого исследования согласуются с вышеизложенными данными о первичных изменениях в активности генов и указывают на важную роль процессов репарации ДНК в формировании АО.

На участие ферментов репарации ДНК, а также других систем поддержания гомеостаза клетки в формировании АО указывают результаты еще одного исследования (Rithidech et al., 2012). В нем с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией были исследованы белки, присутствующие в культуральной жидкости после инкубации лимфоцитов периферической крови человека. В среде, в которой культивировались клетки после облучения в дозе 3 сГр + 1 Гр, т. е. после формирования АО, обнаружено 17 белков, отсутствующих в среде культивирования клеток, облученных в дозе 1 Гр. 6 из обнаруженных белков — это белки антиоксидантной защиты, 3 — иммунного ответа, 5 — белки контроля клеточного цикла. Кроме того, обнаружены гидроксилаза и миозин, а также бис-(5'-аденозил)-трифосфатаза — белок, выполняющий функцию репарации ДНК.

Возникает вопрос о том, какая или какие из многочисленных репарационных систем принимают участие в формировании АО. Некоторые авторы, основываясь на результатах исследования перевиваемых культур клеток мыши и фибробластов человека, полагают, что это системы негомологичного воссоединения разорванных концов ДНК и системы их гомологичного воссоединения (Sasaki et al., 2002). Данные авторы предполагают, что путь репарации двухнитевых разрывов ДНК в адаптированных клетках может также отличаться от их пути репарации в неадаптированных клетках и сопровождаться меньшим числом ошибок.

Однако Осипов и соавторы (2009), изучавшие параллельно АО и репарацию ДНК лимфоцитов человека с использованием метода ДНК-комет, показали, что развитие АО в делящихся лимфоцитах в течение 24–72 ч после облучения в адаптирующей дозе не сопровождается достоверным увеличением эффективности репарации двухнитевых разрывов ДНК путем негомологичного воссоединения.

Есть сведения об участии других репарационных систем в формировании АО. Показательны, например, результаты работы Хафера и соавторов (Hafer et al., 2007), хотя объектом исследования в ней были не лимфоциты, а клетки СНО. Было обнаружено, что у клеток СНО дикого типа после облучения в малой дозе повышается радиорезистентность и уменьшается частота мутаций гена *HPRT*, т. е. изменения обоих показателей подтверждают АО. Клетки, мутантные по генам ферментов, участвующих в эксцизионной репарации (*ERCC1*, *ERCC3*, *ERCC4* и *ERCC5*), не теряют способности к АО, и, следовательно, соответствующие ферменты репарации не участвуют в формировании реакции клетки на облучение в малой дозе. Напротив, инактивация гена *ERCC2*, также участвующего в эксцизионной репарации, лишает клетки способности к АО, и можно предполагать, что соответствующий фермент участвует в формировании АО.

Близкий результат получен при изучении радиочувствительности лимфобластоидных клеток человека ТК6, предварительно обработанных алкилирующим мутагеном МННГ (Yamamoto et al., 2011). В случае этих клеток

предварительная обработка МННГ приводила к снижению радиочувствительности, тогда как у клеток МТ1, представляющих собой разновидность клеток ТК6, дефектную по системе репарации ошибочно спаренных оснований (mismatch репарация), АО не возникает.

В заключение этого раздела обзора, не претендующего на полное изложение всех опубликованных экспериментальных данных о роли репарации повреждений ДНК в процессе формирования АО, можно заключить, что ряд данных в некоторых случаях указывает на их участие в этом процессе, но не доказывает ее главенствующую и инициирующую роль. Ни на уровне экспрессии мРНК, ни на уровне синтеза белков не получено данных, указывающих на индукцию каких-либо иных дополнительных репаративных систем кроме тех, что обычно индуцируются в ответ на действие повреждающего фактора.

В то же время остается открытым вопрос о причинах изменений функционирования репарационных систем после адаптирующего воздействия, которые могут обеспечивать повышенную радиорезистентность, т. е. формировать АО. Выше мы указывали на мнение Сасаки и соавторов (Sasaki et al., 2002) о том, что путь репарации двухнитевых разрывов ДНК в адаптированных клетках, возможно, отличается от пути их репарации в неадаптированных клетках и сопровождается меньшим числом ошибок.

В одном из обзоров прошлых лет (Szumiel, 2005) на основе обобщения результатов работ, посвященных изучению влияния адаптирующего облучения на процесс репарации ДНК после повреждающего облучения в большой дозе, автор высказывает сомнения в важности изменений в системе репарации ДНК, индуцированной повреждениями ДНК, в процессе радиоадаптации. Опираясь на гипотезу Радфорда (Radford, 2002), автор предполагает, что АО может развиваться не в результате репарации повреждений ДНК, а вследствие изменений в процессе транскрипции с поврежденной ДНК и уменьшения доли двухнитевых разрывов ДНК, фиксируемых как aberrации.

В литературе неоднократно обсуждалась возможная роль других систем поддержания гомеостаза клетки в формировании АО. В частности, обсуждался механизм формирования АО, основанный на индукции ферментов антиоксидантной защиты после облучения клеток в адаптирующих дозах. Теоретически увеличение концентрации таких ферментов могло бы снизить уровень повреждения ДНК клетки при последующем действии облучения в большой дозе. Хотя исследования на генном уровне не выявили активации генов антиоксидантной защиты после адаптирующего облучения, нельзя исключить возможность участия этих ферментов в формировании АО.

К сожалению, в опубликованных к настоящему времени обзорных работах в русле данной тематики не рассмотрены лимфоциты человека (Miura, 2004), однако косвенные данные указывают на возможность участия ферментов системы антиоксидантной защиты в развитии АО лимфоцитов. Так, например, в работе Осипова с соавторами (2009) было показано, что уровень двухнитевых разрывов ДНК, обнаруживаемых в стимулированных лимфоцитах, облученных в ударной дозе 10 Гр, достоверно уменьшается, если клетки предварительно облучить в адаптирующей дозе 5 сГр. Эффективность репарации двухнитевых разрывов ДНК путем негомологичного воссоединения в адаптированных и неадаптированных клетках при этом оказалась одинаковой, поэтому авторы

предполагают, что основная роль в формировании АО принадлежит процессам, предотвращающим образование радиоиндуцированных двухнитевых разрывов ДНК, а не активации их репарации. Однако, как отмечалось выше, среди генов, активность которых возрастает после облучения в малой дозе, не обнаружено соответствующих генов (Ding et al., 2005; Fachin et al., 2007; Saini et al., 2012).

С другой стороны, в среде, в которой культивировались клетки после облучения в дозе 3 сГр + 1 Гр, т. е. после формирования АО, обнаружены белки антиоксидантной защиты, отсутствующие в среде культивирования клеток, облученных только в дозе 1 Гр (Rithidech et al., 2012). Это различие можно объяснить, предположив, что синтез антиоксидантных белков в процессе формирования АО действительно происходит и соответствующие ферменты действительно принимают участие в его формировании, но не на инициирующих стадиях.

Предполагается участие в формировании АО индуцильного фермента Mn-супероксиддисмутазы — основного митохондриального антиоксиданта клеток человека (Spitz et al., 2004). Показано, что выживаемость иммортилизованных кератиноцитов клеток кожи человека, облученных вначале в дозе 10 сГр и через 6 ч в дозе 5 Гр, выше по сравнению с клетками, облученными только в дозе 5 Гр, т. е. наблюдается АО. Показано также, что активность обсуждаемого фермента в клетках возрастает после облучения их в дозе 10 сГр. Авторы полагают, что этот фермент кроме выполнения основной функции — детоксикации супероксид анион-радикала — взаимодействует с большим числом различных белков и выполняет роль сигнального регулятора в индуцированном стрессом АО (Eldridge et al., 2012).

На существование иных путей формирования АО указывают также многочисленные сообщения об участии в этом процессе самых разных веществ и классов метаболически активных соединений — кластеринов (Klokov et al., 2004), металлотионеинов (Котеров, Филиппович, 2002), гем оксигеназы 1 (Rothfuss et al., 2001), антагониста кальция TMB-8 (Wojewodska et al., 1994), глиоксалазы 1 (Tiku, Kale, 2001) и др., но конкретная роль этих веществ в измененииadioчувствительности клетки остается все еще неизвестной.

До этого момента мы рассматривали процессы, способные формировать АО и протекающие внутри клетки. Но тот же итог может обеспечить протекание процессов на уровне всей совокупности изучаемых клеток, т. е. на уровне клеточной популяции. Например, в литературе неоднократно высказывались предположения о возможности участия апоптоза в формировании АО (Боднарчук, 2003). Если бы адаптирующее облучение приводило к увеличению доли клеток, удаляемых из популяции после облучения в ударной дозе за счет апоптоза, это могло бы объяснить феномен АО.

Исследований, в которых проводили непосредственную оценку доли клеток, подвергающихся апоптозу в культуре лимфоцитов после адаптирующего и проявляющего облучений по сравнению с облучением клеток только в проявляющей дозе, известно относительно немного.

Имеются данные о влиянии адаптирующего облучения на частоту появления апоптотических клеток у нестимулированных лимфоцитов (Cregan et al., 1999). Клетки облучали вначале в дозе 10 сГр и через 6 ч — в проявляющей дозе 2 Гр. Доля апоптотических клеток в популяции оценивали через 24 ч после облучения в дозе 2 Гр. Было обнаружено, что предварительное адаптирующее облуче-

ние повышает долю апоптотических клеток в популяции (по сравнению с вариантом облучения клеток только в дозе 2 Гр) у лимфоцитов 8 из 12 доноров. Адаптирующие дозы 5 и 25 сГр также приводили к увеличению доли апоптотических клеток. Однако трудно оценить, в какой мере закономерности, выявленные на нестимулированных лимфоцитах, относятся к стимулированным лимфоцитам, а также к тем схемам экспериментов по изучению АО, в которых промежуток времени между воздействием проявляющей дозы и моментом оценки радиочувствительности составляет не 24 ч, а гораздо меньшее время. Но несомненно, результат отмеченной выше работы подтверждает принципиальную возможность участия апоптоза в процессе формирования АО.

В связи с этой проблемой изучалась возможная роль гена *Tp53* для формирования АО, но однозначных результатов получено не было. Уместно отметить, что адаптирующее облучение лимфоцитов не изменяет экспрессию гена *Tp53* (см. выше).

Проводились исследования реакции лимфобластоидных клеток линии ТК6, несущих полноценный ген *Tp53*, и моноцитных лейкемических клеток линии U937, несущих мутантный ген *Tp53* (Hendrikse et al., 2000). Было обнаружено, что у клеток ТК6 в случае нормально функционирующего гена *Tp53* после облучения в сочетанных дозах 10 сГр и 2 Гр через 3 ч не изменяется частота клеток с микроядрами, т. е. АО не возникает. Напротив, у клеток U937 при нарушенной функции этого гена наблюдается АО.

Примечательно, однако, что у обоих штаммов при сочетанном облучении наблюдается снижение частоты апоптотических клеток по сравнению с облучением в одной дозе. Авторы делают вывод, что для формирования АО, регистрируемого по такому показателю, как частота клеток с микроядрами, нет необходимости в индукции синтеза и функционирования белка p53 и что АО, регистрируемый по цитогенетическому показателю, не связан с процессом апоптоза (Hendrikse et al., 2000).

К выводу об отсутствии связи между процессом апоптотической гибели клеток, функционированием гена *Tp53* и возможностью формирования АО пришли и другие авторы (Varès et al., 2011), которые изучали возможность формирования АО у лимфобластоидных клеток ТК6 (*p53*+/+), АНН1 (*p53*−/+) и NH32 (*p53*−/−). Клетки облучали в адаптирующей дозе 2—10 сГр и через 6 ч — в проявляющей дозе 1 Гр тяжелыми ионами углерода или неона. АО, регистрируемый по такому показателю, как частота мутаций в локусе HPRT, наблюдался у первых двух штаммов, но не наблюдался у штамма, не экспрессирующего белок p53. С другой стороны, доля апоптотических клеток, наблюдаемая в адаптированных и неадаптированных клетках через 24 или 48 ч после проявляющего облучения, была одинакова, хотя и различалась в разных штаммах. Параллельно была изучена кинетика репарации двухнитевых разрывов ДНК (по содержанию гистона γH2AX). Авторы приходят к заключению о том, что формирование АО в случае изученной модели скорее связано с репарацией двухнитевых разрывов ДНК, чем с процессом апоптоза (Varès et al., 2011).

К иному заключению пришли авторы исследования, в котором объектом исследования были те же лимфобластоидные клетки человека линии ТК6, характеризующиеся нормальным синтезом белка p53 (Schwartz et al., 2007). Параллельно изучали вариант этой линии ТК6-BCL2, характеризующийся сверхэкспрессией гена *BCL2* и устой-

чивый к радиационно-индуцированному апоптозу, и вариант NH32, несущий неактивный ген *Trp53* и поэтому также устойчивый к апоптозу.

Клетки вначале облучали в дозе 10 сГр и через 4 ч подвергали облучению в проявляющей дозе 1.5 Гр, после чего оценивали частоту аберраций хроматидного типа. Адаптивный ответ формировался у клеток ТКБ, но не у клеток двух других штаммов. Согласно показателю частоты апоптотических клеток АО не формировался ни у одного из изученных штаммов. На основании полученных данных авторы делают вывод о необходимости для формирования АО полноценного функционирования гена *Trp53*.

В целом этот вопрос требует дальнейшего изучения. Нам кажется, что одной из причин получения противоречивых данных является использование для решения вопроса о наличии или отсутствии АО различных по природе методов оценки радиочувствительности.

В ряде работ был показан еще один механизм формирования АО. В популяции лимфоцитов, облученной в адаптирующей и ударной дозах, по сравнению с популяцией, облученной только в ударной дозе, возрастает доля неповрежденных лимфоцитов, в результате снижаются показатели радиочувствительности. В одной из работ (Серебряный и др., 2008б) была изучена способность к формированию АО лимфоцитов периферической крови 15 здоровых доноров после облучения в адаптирующей дозе 5 сГр и проявляющей — 1 Гр. Оценку изменения радиочувствительности производили по частоте нестабильных аберраций хромосом. Использовали три показателя — долю клеток с аберрациями хромосом среди всех просмотренных клеток, число аберраций хромосом на одну просмотренную клетку и число аберраций хромосом на одну аберрантную клетку.

Было обнаружено, что лимфоциты 3 из 11 доноров формировали АО согласно изменениям доли аберрантных клеток в популяции и числа аберраций хромосом на одну просмотренную клетку, но при этом среднее число аберраций в аберрантной клетке не снижалось.

Налицо явное противоречие, так как, согласно полученным данным, в популяции снижается доля поврежденных клеток, а степень поврежденности аберрантных клеток не изменяется. Невозможно представить ситуацию, когда происходит полная элиминация повреждений у одной части клеток в популяции, а у остальных клеток повреждения вообще не удаляются. Если бы АО, регистрируемый по двум вышеуказанным показателям, формировался бы в результате каких-либо внутриклеточных процессов, например процесса reparации повреждений или в результате работы антиоксидантных ферментов, то это привело бы к снижению всех трех изученных показателей.

Для объяснения механизма формирования АО у этих доноров было проанализировано распределение просмотренных метафазных пластинок по числу аберраций в них. Было обнаружено, что после двойного облучения по сравнению с распределением после облучения только в дозе 1 Гр достоверно возрастает доля клеток, не содержащих аберраций хромосом. В результате этого снижается доля аберрантных клеток в популяции, снижается также число аберраций, приходящихся на одну просмотренную клетку, но число аберраций в аберрантных клетках не изменяется.

Причина, по которой в популяции после адаптирующего и проявляющего облучений возрастает доля непо-

врежденных клеток, неизвестна. Можно обсуждать две возможные причины: 1) усиление дополнительной (к ФГА) стимуляции лимфоцитов адаптирующим облучением и 2) гибель поврежденных клеток; однако для выбора между этими возможностями необходимы более детальные и углубленные исследования. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют о возможности протекания каждого из этих процессов. Так, показано, что облучение в дозах 2 и 5 сГр стимулирует пролиферацию нормальных диплоидных клеток человека (Suzuki et al., 2001; Kim et al., 2007), и этот факт говорит в пользу первой причины увеличения доли неповрежденных клеток в популяции. В литературе также описан феномен стимулирующего действия облучения в малой дозе на гемопоэтические клетки костного мозга мышей и формирование параллельно адаптивного ответа по цитогенетическим показателям (Wang, Cai, 2000). В целом в этой связи следует отметить существующее в литературе мнение о родстве двух феноменов — адаптивного ответа и гормезиса (Upton, 2001). О потенциальной возможности участия процессов апоптоза в формировании АО написано выше.

Таким образом, у лимфоцитов доноров этой группы АО формируется в результате процессов, изменяющих состав клеточной популяции и называемых популяционным сдвигом (Серебряный и др., 2004). В случае лимфоцитов остальных доноров АО возникает в результате сочетания двух механизмов — reparационных процессов и популяционного сдвига.

Возможность формирования АО путем популяционного сдвига была показана и в случае изучения АО с использованием микроядерного теста с цитохалазином В (Серебряный и др., 2003, 2004, 2007). В некоторых популяциях доля поврежденных клеток после сочетанного облучения (5 сГр + 1 Гр) по сравнению с облучением только в дозе 1 Гр уменьшается, и по стандартному показателю — доле двуядерных клеток с микроядрами среди всех двуядерных клеток — фиксируется АО. Однако более подробный анализ показал, что хотя доля двуядерных клеток с микроядрами среди всех двуядерных клеток и снижается, во всей популяции доля таких двуядерных клеток в обоих вариантах опыта одинакова. По мнению авторов, в этих случаях АО возникает по механизму популяционного сдвига, описанному выше, в результате увеличения в популяции доли неповрежденных двуядерных клеток, что снижает соответствующие показатели радиочувствительности.

Заключение

Таким образом, даже у одного объекта — лимфоцитов периферической крови человека — нельзя выделить единственный механизм формирования АО на воздействие различных по природе факторов. Установлено, что АО может возникать в результате разных процессов. Снижение повреждающего действия облучения в ударной дозе может быть достигнуто в результате как совместного, так и раздельного действия систем reparации, удаляющих предмутационные повреждения генома, работы антиоксидантных ферментов, дезактивирующих активные формы кислорода, а также вследствие изменения структуры популяции лимфоцитов в результате активизации их пролиферации или апоптоза. Однако изучение влияния облучения в малой адаптирующей дозе на экспрессию генов не выявило активации генов, ответствен-

ных за процессы, формирующие АО, следовательно, они не инициируются напрямую действием внешнего индуцирующего АО фактора.

Комплексный характер природы АО в разной степени отражается в каждом из используемых критериев оценки радиочувствительности и предопределяет, вероятно, неудачи попыток выявить влияние одного из перечисленных факторов на формирование АО. Практически без ответа остается вопрос о том, каким образом сигналы о нарушении гомеостаза клетки реализуются в изменении эффективности работы ферментных систем, обеспечивающих устойчивость ее при последующих «сильных» воздействиях.

Состояние клетки в период между нарушением гомеостаза и началом функционирования систем, обеспечивающих защиту от последующего повреждающего воздействия, ряд исследователей определяют как состояние стресса.

По Селье (1979), «стресс есть неспецифический ответ организма на любое предъявленное ему требование». В свете этого определения АО можно рассматривать как «неспецифическую потребность осуществлять приспособительные функции и тем самым восстановить нормальное состояние» после облучения в малой дозе. Если за фазой перехода в состояние стресса не следует сильное, «ударное» воздействие, то через некоторое время клетка переходит в нормальное «спокойное» состояние и способность к АО исчезает.

Здесь уместно вспомнить интересную закономерность, выявленную Пелевиной и соавторами (2012) в результате изучения лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, доноров, подвергшихся облучению, а также от больных злокачественными новообразованиями. Во всех случаях наблюдается одна и та же закономерность: в среднем радиочувствительность клеток, измеренная в контролльном варианте, без облучения в адаптирующей дозе, выше у лимфоцитов, формирующих АО, чем у лимфоцитов, неспособных к АО, и тем более у лимфоцитов, радиочувствительность которых повышается после облучения в адаптирующей дозе. Эта закономерность подтверждается при использовании как метафазного анализа, так и микроядерного теста. В последнем случае она выявляется при использовании как схемы облучения G₁—G₁, так схемы G₁—G₂.

Описанный феномен позволяет сделать некоторые предположения об инициальных событиях, происходящих при формировании АО. Он позволяет предполагать, что не все лимфоциты в популяции переходят в состояние стресса и затем формируют АО, а лишь те, радиочувствительность которых оказалась достаточно велика для того, чтобы воздействие радиации (или других факторов) в малой дозе перевело клетки в состояние стресса.

В этой связи следует отметить сходство и родство состояния клетки после адаптирующего облучения с еще одним стрессовым состоянием — состоянием после теплового шока. С одной стороны, тепловой шок индуцирует радиационный АО у лимфоцитов человека (Cai, Jiang, 1995), причем авторы подчеркивают, что гипертермия и радиация в малой дозе индуцируют АО по одному механизму. С другой стороны, показано, что индуцируемый тепловым шоком белок 70 (Hsp4 или HSP70) участвует в формировании АО у клеток фиброзаркомы или у спленоцитов мышей (Park et al., 2000; Kang et al., 2002; Seo et al., 2006).

Изложенные выше данные позволяют заключить, что адаптивный ответ не является специфическим защитным

радиобиологическим феноменом, а является следствием универсального биологического явления — стресс-реакции клетки, вызванной внешним воздействием. АО, с нашей точки зрения, можно расценивать как регуляторный феномен. Сигналом-триггером для перехода в состояние стресса, к попыткам «осуществить приспособительные функции и тем самым восстановить нормальное состояние», к увеличению радиоустойчивости клетки может являться, например, увеличение концентрации активных форм кислорода, возникающее в клетке после облучения в малой дозе, а также, возможно, неизвестные пока метаболические изменения. Другими словами, после облучения в малой дозе клетка переходит в состояние стресса и мобилизует все возможные способы повышения устойчивости, в том числе и радиоустойчивости. Остается, однако, практически неизученной причина, по которой ферментные системы клетки после перехода ее в состояние стресса функционируют более эффективно и обеспечивают снижение радиочувствительности. Выбор конкретного способа повышения радиорезистентности зависит также от генотипа клетки, условий проведения эксперимента и т. д. Следствиями состояния стресса могут быть также увеличение темпов деления клеток, злокачественная трансформация и, напротив, повышение устойчивости к малигнизации, гормезис и мн. др.

Автор выражает искреннюю благодарность И. И. Пелевиной за плодотворное обсуждение всех аспектов этой работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01442а).

Список литературы

- Боднарчук И. А. 2003. Анализ роли репарации ДНК, регуляции клеточного цикла и апоптоза в радиационно-индцированном адаптивном ответе клеток млекопитающих. Радиационная биология. Радиоэкология. 43 (1) : 19—28. (Bodnarchuk I. A. 2003. Analysis of the role of DNA repair, regulation of cell cycle and apoptosis in the radiation-induced adaptive response of mammalian cells. Radiats. Biol. Radioecol. 43 (1) : 19—28.)
- Котеров А. Н., Филиппович И. В. 2002. Радиоадаптивный ответ *in vitro* нестимулированных лимфоцитов крыс по металlothioneиновому тесту. Радиационная биология. Радиоэкология. 42 (2) : 130—135. (Koterov A. N., Filippovich I. V. 2002. Radioadaptive response *in vitro* of unstimulated rat lymphocytes according to metallothionein test. Radiats. Biol. Radioecol. 42 (2) : 130—135.)
- Осипов А. Н., Лизунова Е. Ю., Воробьев Н. Ю., Пелевина И. И. 2009. Индукция и репарация двунитевых разрывов ДНК в лимфоцитах крови человека, облученных в адаптирующей дозе. Радиационная биология. Радиоэкология. 49 (1) : 42—45. (Osipov A. N., Lizunova E. Yu., Vorob'eva N. Yu., Pelevina I. I. 2009. Double-strand DNA breaks induction and repair in human blood lymphocytes irradiated with adapting dose. Radiats. Biol. Radioecol. 49 (1) : 42—45.)
- Пелевина И. И., Алещенко А. В., Антошина М. М., Кудряшова О. В., Рябченко Н. И., Аклеев А. В. 2012. Изменение радиочувствительности лимфоцитов крови человека после облучения в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 52 (5) : 481—486. (Pelevina I. I., Aleshchenko A. V., Antoshchina M. M., Kudriashova O. V., Riabchenko N. I., Akleev A. V. 2012. Changes in cellular radiosensitivity after low dose irradiation. Radiats. Biol. Radioecol. 52 (5) : 481—486.)
- Пелевина И. И., Алещенко А. В., Антошина М. М., Рябченко Н. И., Семенова Л. П., Серебряный А. М. 2007. Индивиду-

альная вариабельность в проявлении адаптивного ответа клеток человека на воздействие ионизирующей радиации. Подходы к ее определению. Радиационная биология. Радиоэкология. 47 (6) : 658—666. (Pelevina I. I., Aleshchenko A. A., Antoshchikina M. M., Riabchenko N. I., Semenova L. P., Serebrianyi A. M. 2007. An individual variability of the adaptive response to irradiation in human cells. Approach to its determination. Radiats. Biol. Radioecol. 47 (6) : 658—666.)

Пелевина И. И., Алещенко А. В., Афанасьев Г. Г., Гомлив Б. Я., Кудряшова О. В., Носкин Д. А., Семенова Л. П., Сотникова Е. Н., Серебряный А. М. 2000. Феномен повышения радиочувствительности лимфоцитов после облучения в малых адаптирующих дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 40 (5) : 544—548. (Pelevina I. I., Aleshchenko A. V., Afanas'ev G. G., Gotlib V. Ia., Kudriashova O. V., Noskin D. A., Semenova L. P., Sotnikova E. N., Serebrianyi A. M. 2000. Increased radiosensitivity after irradiation of lymphocytes low adaptive doses. Radiats. Biol. Radioecol. 40 (5) : 544—548.)

Селье Г. 1979. Стress без дистресса. М.: Прогресс. 123 с. (Selye H. 1974. Stress without distress. Philadelphia: Lippincott. 171 p.)

Серебряный А. М. 2011. Радиационный адаптивный ответ как стресс-реакция клетки. Радиационная биология. Радиоэкология. 51 (4) : 399—404. (Serebrianyi A. M. 2011. Radiation adaptive response as a stress reaction of a cell. Radiats. Biol. Radioecol. 51 (4) : 399—404.)

Серебряный А. М., Алещенко А. В., Антошина М. М., Кудряшова О. В., Рябченко Н. И., Семенова Л. П., Пелевина И. И. 2008а. Изменение радиочувствительности лимфоцитов крови человека в разных митотических циклах после облучения в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 48 (6) : 713—720. (Serebrianyi A. M., Aleshchenko A. V., Antoshchikina M. M., Kudriashova O. V., Riabchenko N. I., Semenova L. P., Pelevina I. I. 2008. The radiosensitivity change of human blood lymphocytes in different mitotic cycles after a low dose irradiation. Radiats. Biol. Radioecol. 48 (6) : 713—720.)

Серебряный А. М., Алещенко А. В., Гомлив Б. Я., Кудряшова О. В., Семенова Л. П., Пелевина И. И. 2003. Клеточный состав популяции лимфоцитов и радиационный адаптивный ответ. Цитология. 45 (1) : 81—85. (Serebrianyi A. M., Aleshchenko A. V., Gotlib V. Ia., Kudriashova O. V., Semenova L. P., Pelevina I. I. 2003. The cell composition in the lymphocyte population and the radiation adaptive response. Tsitologiya. 45 (1) : 81—85.)

Серебряный А. М., Алещенко А. В., Гомлив Б. Я., Кудряшова О. В., Семенова Л. П., Пелевина И. И. 2004. О новом механизме адаптивного ответа. Радиационная биология. Радиоэкология. 44 (6) : 653—656. (Serebrianyi A. M., Aleshchenko A. V., Gotlib V. Ia., Kudriashova O. V., Semenova L. P., Pelevina I. I. 2004. On the new mechanism of adaptive response. Radiats. Biol. Radioecol. 44 (6) : 653—656.)

Серебряный А. М., Алещенко А. В., Гомлив Б. Я., Кудряшова О. В., Семенова Л. П., Пелевина И. И. 2007. О реакции клеточной популяции на облучение в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология. 47 (1) : 93—99. (Serebrianyi A. M., Aleshchenko A. V., Gotlib V. Ia., Kudriashova O. V., Semenova L. P., Pelevina I. I. 2007. On the response of a cell population to low-dose irradiation. Radiats. Biol. Radioecol. 47 (1) : 93—99.)

Серебряный А. М., Антошина М. М., Алещенко А. В., Рябченко Н. И., Пелевина И. И. 2008б. О механизме адаптивного ответа. Оценка способности лимфоцитов крови человека к радиационному адаптивному ответу с помощью разных критериев. Цитология. 50 (5) : 462—466. (Serebrianyi A. M., Antoshchikina M. M., Aleshchenko A. V., Riabchenko N. I., Pelevina I. I. 2008b. The mechanisms of adaptive response. Estimation of capacity of human blood lymphocytes to radiation adaptive response using different criteria. Tsitologiya. 50 (5) : 462—466.)

Aghamohammadi S. Z., Savage J. R. K. 1991. A BrdU pulse double-labelling method for studying adaptive response. Mutat. Res. 251 : 133—141.

Ahmed K. M., Fan M., Nantajit D., Cao N., Li J. J. 2008. Cyclin D1 in low dose radiation-induced adaptive resistance. Oncogene. 27 : 6738—6748.

Bai Y., Chen D. 1993. Accumulative effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes. Mutat. Res. 302 : 191—196.

Berglund S. R., Rocke D. M., Dai J., Schwietert C. W., Santana A., Stern R. L., Lehmann J., Hartmann Siantar C. L., Goldberg Z. 2008. Transient genome-wide transcriptional response to low-dose ionizing radiation *in vivo* in humans. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 70 : 229—234.

Bosi A., Olivieri G. 1989. Variability of the adaptive response to ionizing radiation in human. Mutat. Res. 211 : 13—17.

Cai L., Jiang J. 1995. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic damage caused by subsequent X-irradiation. Radiat. Res. 143 : 26—33.

Cai L., Liu S.-Z. 1990. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 58 : 187—194.

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 Zeeeland A. A., Huiskamp R., Mullenders L. H. F., Kleinjans J. C. S. 2005. Pre-exposure to low doses: modulation of X-ray-induced DNA damages and repair? Radiat. Res. 164 : 383—390.

Cregan S. P., Brown D. L., Mitchel R. E. J. 1999. Apoptosis and the adaptive response in human lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol. 75 : 1087—1094.

Ding L.-H., Shingyoji M., Chen F., Hwang J. J., Burma S., Lee C., Cheng J. F., Chen D. J. 2005. Gene expression profiles of normal fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. Radiat. Res. 164 : 17—26.

Eldridge A., Fan M., Woloschak G., Grdina D. J., Chromy B. A., Li J. J. 2012. Manganese superoxide dismutase interacts with a large scale of cellular and mitochondrial proteins in low-dose radiation-induced adaptive radioprotection. Free Radic. Biol. Med. 53 : 1838—1847.

Fachin A. L., Mello S. S., Sandrin-Garcia P., Junta C. M., Donadi E. A., Passos G. A., Sakamoto-Hojo E. T. 2007. Gene expression profiles in human lymphocytes irradiated *in vitro* with low doses of gamma rays. Radiat. Res. 168 : 650—665.

Fan S., Vijayalaxmi G., Burkart M., Burkart W. 1990. Adaptive response to 2 low doses of X-rays in human blood lymphocytes. Mutat. Res. 243 : 53—56.

Hafer K., Iwamoto K. S., Scuric Z., Schiest R. H. 2007. Adaptive response to gamma radiation in mammalian cells proficient and deficient to components of nucleotide excision repair. Radiat. Res. 168 : 168—174.

Hendrikse A. S., Hunter A. J., Keraan M., Blekkenhorst G. H. 2000. Effects of low dose irradiation on TK6 and U937 cells: induction of p53 and its role in cell-cycle delay and the adaptive response. Int. J. Radiat. Biol. 76 : 11—21.

Kang C. M., Park K. P., Cho C. K., Seo J. S., Park W. Y., Lee S. J., Lee Y. S. 2002. HspA4 (HSP70) is involved in the radioadaptive response: results from mouse splenocytes. Radiat. Res. 157 : 650—655.

Karran P., Lindahl T., Griffin B. 1979. Adaptive response to alkylating agents involves alteration *in situ* of O6-methylguanine residues in DNA. Nature. 280 : 76—77.

Khandogina E. K., Mutovin G. R., Zvereva S. V., Antipov A. V., Zverev D. O., Akifyev A. P. 1991. Adaptive response in irradiated human lymphocytes: radiobiological and genetical aspects. Mutat. Res. 251 : 181—186.

Kim C. S., Kim J. K., Nam S. Y., Yang K. H., Jeong M., Kim H. S., Kim C. S., Jin Y. W., Kim J. 2007. Low-dose radiation stimulates the proliferation of normal human lung fibroblasts via a transient activation of Raf and Akt. Mol. Cells. 24 : 424—430.

Kirsch-Volders M., Sofuni T., Aardema M., Albertini S., Eastmond D., Fenech M., Ishidate M., jr., Kirchner S., Lorge E., Morita T., Norppa H., Surralles J., Vanhaeuwaert A., Wakata A. 2003. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. Mutat. Res. 540 : 153—163.

- Klokov D., Criswell T., Leskov K. S., Araki S., Mayo L., Boothman D. A. 2004. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat. Res.* 568 : 97—110.
- Matsumoto H., Hamada N., Takahashi A., Kobayashi Y., Ohnishi T. 2007. Yanguards of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J. Radiat. Res.* 48 : 97—106.
- Miura Y. 2004. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J. Radiat. Res.* 45 : 357—372.
- Olivieri G., Bodocote J., Wolff S. 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223 : 594—597.
- Park S.-H., Lee S. J., Chang H. Y., Kim T. H., Cho C. K., Yoo S. Y., Lee Y. S. 2000. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat. Res.* 153 : 318—326.
- Radford I. R. 2002. Transcription-based model for the induction of interchromosomal exchange events by ionizing irradiation in mammalian cell lines that undergo necrosis. *Int. J. Radiat. Biol.* 78 : 1081—1093.
- Rithidech K. N., Lai X., Honikel L., Reungpatthanaphong P., Witzmann F. A. 2012. Identification of proteins secreted into the medium by human lymphocytes irradiated *in vitro* with or without adaptive environments. *Health Phys.* 102 : 39—53.
- Rothfuss A., Radermacher P., Speit G. 2001. Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment. *Carcinogenesis*. 22 : 1979—1985.
- 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.
- Saini D., Shelke S., Mani Vannan A., Toprani S., Jain V., Das B., Seshadri M. 2012. Transcription profile of DNA damage response genes at G₀ lymphocytes exposed to gamma radiation. *Mol. Cell. Biochem.* 364 : 271—281.
- 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.
- Sannino A., Zeni J., Romeo S., Massa R., Gialanella G., Grossi G., Manti L., Vijayalakshmi, Scarfi M.R. 2014. Adaptive response in human blood lymphocytes exposed to non-ionizing radiofrequency fields: resistance to ionizing radiation-induced damage. *J. Radiat. Res.* 55 : 210—217.
- Sasaki M. S., Ejima Y., Tachibana A., Yamada T., Ishizaki K., Shimizu T., Nomura T. 2002. DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutat. Res.* 504 : 101—118.
- Schwartz J. L., Jordan R., Slovic J., Moruzzi A. M., Kimmel R. R., Liber H. L. 2007. Induction and loss of a TP53-dependent radioadaptive response in the human lymphoblastoid cell model TK6 and its abrogation by BCL2 over-expression. *Int. J. Radiat. Biol.* 83 : 153—159.
- Seo H. R., Chang H. Y., Lee Y. J., Bae S., Lee S. J., Lee Y. S. 2006. p27Cip/Kip is involved in hsp25 or inducible hsp70 mediated adaptive response by low dose radiation. *J. Radiat. Res.* 47 : 83—90.
- Shadley J. D., Dai G. 1992. Cytogenetic and survival adaptive responses in G₁ phase human lymphocytes. *Mutat. Res.* 265 : 273—281.
- Shadley J. D., Wolff S. 1987. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis*. 2 : 95—96.
- Shimizu T., Kato T., Tachibana A., Sasaki M. S. 1999. Coordinated regulation of radioadaptive response by protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase. *Exp. Cell Res.* 251 : 424—432.
- Sorensen K. Y., 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.
- Spitz D. R., Azzam E. I., Li J. J., Gius D. 2004. Metabolic oxidation/reduction and cellular responses to ionizing radiation: unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev.* 23 : 311—322.
- Suzuki K., Kodama S., Watanabe M. 2001. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase and enhances proliferation of normal human diploid cells. *Cancer Res.* 61 : 5396—5401.
- Szumiel I. 2005. Adaptive response: stimulated DNA repair or decrease damage fixation? *Int. J. Radiat. Res.* 81 : 233—241.
- Tiku A. B., Kale R. K. 2001. Radiomodification of glyoxalase I in the liver and spleen of mice: adaptive response and split-dose effect. *Mol. Cell. Biochem.* 216 : 79—83.
- Upton A. C. 2001. Radiation hormesis: data and interpretation. *Critical reviews in toxicology*. 31 : 681—695.
- Varès G., Wang B., Tanaka K., Kakimoto A., Eguchi-Kasai K., Neno M. 2011. Mutagenic adaptive response to high-LET radiation in human lymphoblastoid cells exposed to X-rays. *Mutat. Res.* 706 : 46—52.
- Vijayalakshmi, Leal B. Z., Deahl T. S., Meltz M. L. 1995. Variability in adaptive response to low dose radiation in human blood lymphocytes: consistent results from chromosome aberrations and micronuclei. *Mutat. Ras.* 348 : 45—50.
- Wang G.-J., Cai L. 2000. Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation. *Toxicol. Sci.* 53 : 369—376.
- Wang Z.-Q., Saigusa S., Sasaki M. S. 1991. Adaptive response to chromosome damage in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays. *Mutat. Res.* 246 : 179—186.
- Wojcik A., Aghamohammadi S. Z., Aillaud M., 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 T., Müller W. U. 1996b. Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis*. 11 : 291—297.
- Wojewodska M., Walicka M., Sochanowicz B., Szumiel I. 1994. Calcium antagonist, TMB-8, prevents the induction of adaptive response by hydrogen peroxide or X-rays in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 66 : 99—109.
- Wolff S. 1996. Aspects of adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat. Res.* 358 : 135—142.
- Wolff S. 1998. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implication. *Environ. Health Perspect.* 106 (Suppl. 1) : 277—283.
- Yamamoto A., Sakamoto Y., Masumura K., Honma M., Nohmi T. 2011. Involvement of mismatch repair proteins in adaptive responses induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoureas against γ -induced genotoxicity in human cells. *Mutat. Res.* 713 : 56—63.

Поступила 1 XII 2014

ON THE PLURALITY OF THE WAYS OF RADIATION ADAPTIVE RESPONSE
FORMATION IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

A. M. Serebryanyi

N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow;
e-mail: amserebr@gmail.com

The current review summarizes the results of investigations on the phenomenon of the decrease of cell radiosensitivity after the impact of various damaging factors in small doses. This phenomenon is known as an adaptive response (AR). It has been described in a number of biological objects, but the author has reviewed only the researches that have been done on human peripheral blood lymphocytes. Lymphocyte AR is specifically characterized by the fact that the entire cascade of events that decrease radiosensitivity occurs during one mitotic cycle. This feature distinguishes lymphocyte AR from the phenomenon of cell adaptation to chronic small dose irradiation.

In this review, the author pays special attention to research on the initial stages of the AR formation. The author presumes that the AR occurs as a result of nonspecific intracellular changes that are a signal of the disruption in cell homeostasis. Several researchers define the state that results from this as the state of stress. After a cell transfers to this state there is a launch of biochemical processes that are able to protect the cell in case of future exposure to large doses of damaging factors (including irradiation). These processes are not determined strictly by the initial stimulus and are not initiated directly by the impact of the external factor that induced the AR. The particular method of decreasing radiosensitivity has not been determined and its selection depends on cell genotype, conditions of the experiment, etc. This might be the synthesis of various types of reparation enzymes, the synthesis of antioxidant enzymes, the activation of cell division or apoptosis. Cells that do not turn into the stress state do not form an AR. If there is no damaging shock-like impact after the cell enters the stress, the cell gets back to the normal rest state and the ability to form an AR disappears.

Key words: human blood lymphocytes, adaptive response, stress reaction of cell, DNA repair, antioxidant systems, apoptosis, population shift.