

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 4, Number 322 (2017), 148 – 158

O. G. Cherednichenko, A. L. Pilugina

Institute of General Genetics and cytology CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: cherogen70@mail.ru

**STRESS-SIGNALING BETWEEN IRRADIATED
AND INTACT LYMPHOCYTES OF HUMAN
AT THE INDUCTION OF THE BYSTANDER EFFECT**

Abstract. Under the influence of small doses of mutagenic agents formed an adaptive response, in this case pretreated lymphocytes produced "bystander factor", which is released into the plasma and can be transmitted from irradiated cells to intact. In the process of studying the mechanisms of this process it was necessary to check the possible variant of stress - signaling between the irradiated and intact lymphocytes - apoptosis of radiosensitive cells - formation of extracellular DNA – TLR 9 activation of cellular receptors. The first stage of signal pathway - apoptotic - stopped by introducing into the medium an inhibitor of caspase 3 - Biotin - DEVD - FMK. The second stage - receptor - blocking TLR 9 blocked by the addition of chloroquine. Modification steps stress signaling between the irradiated and intact human lymphocytes using inhibitors to block apoptosis and receptor phases stress signaling showed that bystander induction - factors under the influence of ionizing radiation is transmitted from the irradiated lymphocytes to intact by fragments of extracellular DNA that are released during apoptosis radiosensitive cells and affect cells - witnesses through TLR 9 and other receptors. Inhibition of DNA synthesis, hydroxyurea, and the lack of response associated with the formation of the bystander effect may indicate that the extracellular DNA fragments, which are found in the culture medium or in the plasma of irradiated cells may be secreted into the medium alive, normally functioning cells.

Key words: bystander effect, extracellular DNA, stress signaling, chromosomal aberrations, radiosensitivity.

УДК 575.224.4; 575.1; 616.8

О. Г. Чередниченко, А. Л. Пилюгина

Институт общей генетики и цитологии МОН РК, Алматы, Казахстан

**СТРЕСС-СИГНАЛИЗАЦИЯ МЕЖДУ ОБЛУЧЕННЫМИ
И ИНТАКТНЫМИ ЛИМФОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА
ПРИ ИНДУКЦИИ ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ**

Аннотация. Под воздействием малых доз мутагенных факторов формируется адаптивный ответ, при этом преобработанными лимфоцитами вырабатываются факторы стресс-сигнализации, которые выделяются в плазму и способны передаваться от облученных клеток к интактным. Полученные результаты свидетельствуют, о том, что одним из механизмов принимающих участие в индукции эффекта свидетеля является усиленная экспрессия стрессорных белков и выделение внДНК, которые могут быть либо продуктом апоптоза, либо вновь синтезированными молекулами, либо внДНК с измененными свойствами. Высказано предположение о возможном варианте стресс - сигнализации между облученными и интактными лимфоцитами – апоптоз радиочувствительных клеток – образование внДНК – активация ими клеточных рецепторов TLR9. Первый этап сигнального пути – апоптотический – останавливали введением в культуральную среду ингибитора активности каспазы 3 - Biotin – DEVD – FMK. Второй этап – рецепторный – перекрывали блокированием TLR9, путем добавления в среду культивирования хлорокина, который изменяет pH в эндосомах, где происходит взаимодействие ДНК с TLR9, а его изменение делает невозможным

образование комплексов ДНК с рецепторами. Модификация этапов стресс-сигналикации между облученными и интактными лимфоцитами человека с помощью ингибиторов для блокировки апоптотического и рецепторного этапов стресс - сигнализации, показала, что индукция bystander - факторов под воздействием ионизирующей радиации передается от облученных лимфоцитов к интактным посредством фрагментов внДНК, которые высвобождаются при апоптозе радиочувствительных клеток и воздействуют на клетки - свидетели через TLR9 и другие рецепторы. Кроме того, ингибирование синтеза ДНК оксимочевинной и отсутствие реакции, связанной с формированием адаптивного ответа и эффекта свидетеля, может свидетельствовать, что фрагменты внДНК, которые обнаруживаются в среде культивирования или в плазме облученных клеток могут секретироваться в среду живыми, нормально функционирующими клетками.

Ключевые слова: эффект свидетеля, адаптивный ответ, внДНК, стресс-сигнализация, хромосомные aberrации, радиочувствительность.

Введение. Ионизирующее излучение изменяет состояние клеточных защитных механизмов: систем антиоксидантной защиты, репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, апоптоза и др. Исследование молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе эффектов облучения, является одной из ключевых и наиболее актуальных задач радиационной биологии.

Среди прямых повреждений ДНК, вызываемых ионизирующим излучением, особое внимание заслуживают двунитевые разрывы (ДР) ДНК, не устранение которых в ходе репарации ДНК, приводит к цитогенетическим нарушениям и гибели клеток. Возможно, что именно они являются основным триггером, запускающим процессы клеточного отклика на воздействие ионизирующего излучения. При этом индуцированные радиацией события могут наблюдаться как в облученных, так и в соседних клетках, избежавших попадания ионизирующих частиц. Это явление – показанное и для агентов разной природы – получило название эффекта “свидетеля”, при котором происходит передача сигнала (стресс-сигнализация) между облученными и интактными клетками. Таким образом, могут передаваться, например, сигналы индукции хромосомных aberrаций, инициации апоптоза или адаптивного ответа. Однако, открытие этих клеточных реакций, ставит вопрос о природе и происхождении в среде облученных клеток факторов стресс-сигналикации. Несмотря на активные исследования в этом направлении природа всех факторов сигнальной системы при радиорезистентности и эффекте свидетеля до конца не ясна.

«Эффект свидетеля» может быть обусловлен по крайней мере двумя механизмами: Межклеточными контактами («*gap junction*»), включающими Trp53-опосредуемый путь проведения сигнала повреждения. Другой механизм, не обусловленный непосредственными межклеточными контактами, может быть связан с секрецией биологически активных факторов в культуральную среду или плазму крови. Инкубационная среда от облученных клеток, использованная для культивирования необлученных клеток, индуцирует нестабильность генома [1]. Наблюдающийся эффект связан исключительно с результатом секреции неких факторов из облученных клеток. Секретируемые в среду факторы индуцируют повышение внутриклеточного уровня реактивных форм кислорода, включая супероксид-анион и перекись водорода, которые могут опосредовать повреждения ДНК и, в конечном итоге – нестабильность генома и гибель клеток. Эффект, передающийся факторами культуральной среды, в отличие от первого механизма, является Trp53-независимым как для продукции сигнала облученной клеткой, так и для ответа на сигнал клеткой-реципиентом. На роль факторов стресс-сигналикации предложено много кандидатов. Основное внимание сосредоточено на факторах белковой природы, которые могут экскретироваться облученными клетками и при взаимодействии с клеточными рецепторами клеток свидетелей активировать сигнальные пути [2]. Вместе с тем в последние годы появляются данные о том, что фрагменты ДНК с определенными последовательностями при взаимодействии с соответствующими рецепторами клеток активируют белки семейства стресс-ассоциированных протеинкиназ. Возможными источниками таких факторов, отвечающих за индукцию радиорезистентности и возникновение эффекта свидетеля, могут быть ДНК разного происхождения. Либо это ДНК являющиеся результатом повышения экспрессии некоторых генов в ответ на радиационное воздействие, либо радиочувствительные клетки, гибнущие под действием радиации, т.е. фрагменты внеклеточной ДНК, переходящие в среду культивирования из апоптотических клеток [3]. Таким образом, механизмы индукции радиорезистентности могут включать участие процессов репарации ДНК, апоптоза, всевозможных каскадов сигнальных реакций, конформационных изменений ДНК, и др.

Материал и методы исследования. В работе для цитогенетических экспериментов использовали образцы периферической крови здоровых доноров, проживающих в г. Алматы.

Для выделения вДНК использовали образцы крови:

- 1) здоровых людей проживающих в Алматы (7 человек, возраст от 20 до 40 лет);
- 2) людей из экологически неблагоприятного региона (СИП) – 21 человек, возраст от 25 до 55 лет, людей;
- 3) контактирующих с источниками ионизирующей радиации в силу своей профессиональной деятельности – 44 человека, возраст от 25 до 50 лет;
- 4) людей получивших острое радиационное воздействие в отдаленный период (ликвидаторы ЧАЭС) - 21 человек, возраст от 40 до 60 лет.

Контрольную группу для цитогенетического анализа составили 42 человека из экологически чистого, поселка Таусугур, Талдыкурганской области.

Радиационную обработку цельной крови γ -излучением проводили на аппарате дистанционной лучевой терапии с кобальтовым зарядом «Терагам» с номинальной энергией ускоренных электронов 1,5 МэВ с мощностью доз 0,1 Гр/мин. Использовали дозы 0,05; 2Гр.

Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов проводили по стандартной методике [4]. При анализе метафазных пластинок определяли число клеток с абберациями, а также их число и тип на 100 проанализированных метафаз. На каждый вариант просчитывали от 200 до 400 метафаз. Полученные данные обрабатывали статистическими методами [5].

Определение природы передачи фактора стресс-сигнализации - цельную кровь от доноров мужчин облучали в дозе 0,05 Гр. Через 2 ч. выделяли 3 варианта эксперимента:

- 1) цельная кровь;
- 2) отмытые лимфоциты (лимфоциты осаждали центрифугированием 10 минут при 3000 об/мин., далее к осажденным лимфоцитам добавляли 5 мл среды RPMI-1640, центрифугировали в том же режиме);
- 3) плазма (облученную цельную кровь центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин., и отбирали плазму).

К каждому варианту добавляли цельную кровь от доноров женщин (совместимых по группе крови и резус-фактору). Далее смесь облучали дозой 2 Гр через 4 часа после воздействия малой дозой. Культивирование и хромосомный анализ проводили по описанной выше методике.

Выявление эффекта свидетеля – 1) образцы цельной крови облучали γ -излучением через 2 ч. клетки осаждали центрифугированием, выделяли плазму и замораживали; 2) облученные лимфоциты переводили в среду, содержащую питательную среду RPMI-1640 ("Sigma", США) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия). Суспензии лимфоцитов инкубировали 2 ч при 37°C, затем клетки осаждали центрифугированием, супернатанты замораживали. В дальнейших экспериментах из размороженных препаратов (плазма, культуральная среда) выделяли фрагменты вДНК с целью изучения их в качестве факторов стресс-сигнализации для клеток - свидетелей. Интактные лимфоциты из крови здоровых доноров инкубировали по стандартной методике описанной выше, добавляя к каждому варианту образцы облученной плазмы, среду культивирования облученных лимфоцитов или фрагменты выделенной из них вДНК. По истечении 48 ч инкубации (37°C) готовили цитогенетические препараты для анализа хромосомных аббераций.

Адаптивный ответ индуцировали облучением образцов крови в G₀-стадии клеточного цикла адаптирующей дозой 0,05 Гр γ -излучения, повреждающее воздействие (2 Гр) проводили через 4 ч. на этой же стадии клеточного цикла.

Выделение внеклеточной ДНК из плазмы периферической крови - к 0,5 мл плазмы крови прибавляли 0,1 мл лизирующего буфера (10%-ный лаурилсаркозилат натрия, 0,1 моль/л ЭДТА) и РНКазу А (75 мкг/мл), смесь инкубировали при 37°C 1ч, затем гидролизывали протеиназой К (200 мкг/мл, 37° С, 24 ч). Экстракцию ДНК из инкубационной смеси проводили насыщенным фенолом (2 раза), к фенольному экстракту затем прибавляли ацетат аммония (2 моль/л) и ДНК осаждали 0,8 объемами изопропанола (при -20° С). Осадок ДНК отделяли центрифугированием, промывали 75%-ным водным этанолом и растворяли в 30 мкл воды. Количественную и качественную оценку препаратов ДНК проводили с помощью спектрофотометрического и электрофоретического анализа.

Количественную и качественную оценку препаратов ДНК проводили с помощью спектрофотометрического и электрофоретического анализа.

Блокировка этапов стресс-сигнализации - первый этап сигнального пути – апоптотический – останавливали введением в культуральную среду ингибитора активности каспазы 3 Biotin-DEVD-FMK в конечной концентрации 2 мкмоль/л. Второй этап – рецепторный – перекрывали блокированием TLR9 путем добавления в среду культивирования хлорокина в концентрации 2 мкг/мл. После внесения в культуральную среду каждого из ингибиторов клетки инкубировали 30 мин при 37 °С, до радиационной обработки. Для ингибирования синтеза ДНК использовали – оксимочевину (ОМ) в концентрации 2×10^{-3} М.

Результаты исследования и их обсуждение

Индукция факторов стресс-сигнализации в клетках человека облученных разными дозами ионизирующей радиации. К настоящему времени на разных объектах получены не только доказательства существования эффекта свидетеля в различных типах клеток и при различных сочетаниях ионизирующих облучений, но сделаны также попытки проследить механизм его формирования в плане изучения последовательных процессов на пути его реализации. В ходе обсуждений возник вопрос о возможности передачи фактора стресс-сигнализации.

Исследование индукции эффекта свидетеля начато с решения вопроса выделяется ли он предоблученными клетками в плазму или передается при прямом контакте между клетками. (таблица 1). Для этого использован подход совместного культивирования клеток крови разнополых доноров (цитогенетический маркер - У-хромосома). Обнаружено, что предоблучение мужских лимфоцитов в дозе 0,05 Гр с последующим облучением смеси 2 Гр γ -излучения снижает частоту хромосомных aberrаций в женских лимфоцитах (до 12% по сравнению с 26% без предварительного облучения). Данный эффект наблюдается только в вариантах с предварительно облученной цельной кровью или плазмой, но не с отмытыми лимфоцитами (21%).

Таблица 1 – Определение фракции крови, содержащей фактор стресс-сигнализации

Вариант	Клетки с aberrациями	Всего aberrаций	Структурные aberrации	
			хромосомного типа	хроматидного типа
Мужская цельная Кровь (0,05 Гр) + женская Цельная кровь/2 Гр	12,00±1,40*	15,00±1,59*	4,00±0,88	11,00±1,30
Мужские отмытые Лимфоциты (0,05 Гр) + женская цельная кровь/2 Гр	21,00±1,35**	26,00±1,38**	6,00±1,06	20,00±1,34
Мужская плазма (0,05 Гр) + Женская цельная кровь/2Гр	12,70±1,50*	12,00±1,40*	3,00±0,76	9,00±1,28
2 Гр	26,00±1,38	30,00±1,45	7,00±0,80	23,00±1,33
0,05/2Гр	17,00±0,20	18,00±0,21	8,00±0,86	10,00±0,90
*p≤0,01; 2 ** p≥0,01.				

Таким образом, можно предположить, что фактор стресс-сигнализации вырабатывается предоблученными лимфоцитами и выделяется в плазму, а не передается при прямом контакте между клетками.

В то же время добавление плазмы, выделенной из облученной *invitro* крови к интактным клеткам увеличивает в них частоту хромосомных aberrаций в 3 раза ($3,0 \pm 0,54\%$ по сравнению с $1,0 \pm 0,44\%$, $p \leq 0,05$), т.е. наблюдается эффект свидетеля (bystandereffect).

Таким образом, показано, что фактор стресс-сигнализации выделяется клетками в плазму или культуральную среду, который, с одной стороны, вызывает повышение хромосомных нарушений в

интактных клетках (эффект свидетеля), с другой стороны, они же воспринимают его как защитный сигнал от повреждающей дозы облучения (адаптивный ответ), причем он не зависит от величины предварительного облучения.

Изучение биологической природы факторов стресс-сигнализации. Изучение клеточных реакций связанных с наличием факторов стресс-сигнализации, ставит вопрос о их природе и происхождении в среде облученных клеток. Несмотря на активные исследования в этом направлении природа всех факторов сигнальной системы при радиорезистентности и эффекте свидетеля до конца не ясна.

Предполагается, что, по крайней мере, в некоторых случаях в этот процесс могут вмешиваться, так «называемые» стресс-белки [6, 7]. Для выявления продуктов реакций, запускаемых в клетке малыми дозами радиации белкового происхождения, в предыдущих исследованиях проведено разделение белков плазмы, выделенной из крови не подвергавшейся, каким-либо воздействиям и плазмой, выделенной из цельной крови облученной малой дозой радиации или подвергавшейся температурной обработке [8].

В результате этих исследований показано, что в образцах плазмы, выделенных из цельной крови подвергавшейся тепловому шоку и радиационному воздействию в малой дозе, формируются белки, не обнаруживаемые в контрольной плазме. При этом индуцируемые белки можно разделить на 3 группы: специфичные только для радиационного воздействия (171,8; 164,1; 162,2 Кд), специфичные только для теплового шока (192,7 Кд), и общие при обоих воздействиях (195; 182; 180,9; 179,9 Кд), кроме того, обнаруживаются белки, экспрессия которых увеличивалась под воздействием ионизирующего излучения и теплового шока. Эти результаты вполне согласуются с данными по идентификации и характеристике плейотропических белков экспрессируемого ответа, которые активируются при X-облучении в клетках человеческой малигнизированной меланомы. При этом молекулярные массы обнаруженных 8 X-индуцированных полипептидов, как и в нашем случае, лежат в пределах 126-275 Кд.

Подтверждением участия белков в формировании адаптивного ответа и эффекте свидетеля явилось изучение влияния ингибитора синтеза белка циклогексимида (ЦГ) на выход аберраций хромосом в культуре лимфоцитов человека, индуцированных γ -радиацией в G_0 стадии клеточного цикла (таблица 2). Добавление ЦГ к необлученной донорской крови не приводит к достоверному увеличению частоты хромосомных аберраций.

Таблица 2 – Влияние ингибиторов синтеза белка и ДНК на частоту хромосомных аберраций и формирование адаптивного ответа

Вариант	Клеток с аберрациями, %	Всего аберраций, %	Хромосомного типа, %	Хроматидного типа, %
Контроль	1,89±0,43	1,89±0,43	-	1,89±0,43
0,05 Гр	7,00±0,80	7,00±0,80	2,00±0,43	5,00±1,69
2 Гр	25,00±1,37	31,00±1,46	21,00±1,29	10,00±0,95
0,05 / 2 Гр	17,00±1,19	18,70±1,23*	4,60±0,66	14,10±1,10
К + ЦГ	3,00±0,98	3,00±0,98*	-	3,00±0,98
0,05 Гр + ЦГ	12,00±1,87	13,00±1,94*	7,00±1,47	6,00±1,37
2 Гр + ЦГ	40,00±2,82	48,00±2,88*	32,00±2,69	16,00±2,11
0,05Гр+ЦГ/2Гр	42,00±2,84	55,00±2,87*	35,00±2,75	20,00±2,30
0,05 Гр+ЦГ(3ч)/2 Гр	14,00±1,13	15,00±1,69*	13,00±0,98	2,00±0,81
*p≤0,01.				

При добавлении ЦГ к донорской крови сразу после γ -излучения независимо от дозы, наблюдалось значительное увеличение частоты хромосомных аберраций по сравнению с частотой цитогенетических нарушений соответствующих повреждающих факторов. При этом добавление ЦГ сразу после адаптирующей дозы с последующей двукратной отмывкой и дальнейшая обработка повреждающей дозой радиации не приводило к формированию адаптивного ответа, напротив, наблюдалась радиосенсибилизация. Однако добавление его через 3 часа после адаптирующей дозы

не оказывало отрицательного воздействия на его формирование. По литературным данным время репарации индуцированных радиацией повреждений ДНК в не стимулированных лимфоцитах, связанных с синтезом белка составляет 1,5 часа [9]. В связи с этим полученные нами результаты вполне объяснимы – добавление ЦГ через 3 часа после адаптирующего воздействия не влияет на формирование адаптивного ответа и выход хромосомных aberrаций, так как белки, связанные этим процессом и/или процессом репарации к этому времени уже выделились и/или процесс репарации основных повреждений уже завершён. Таким образом, одним из компонентов факторов стресс-сигнализации, индуцируемых малыми дозами радиации, вероятно, является совокупность обнаруженных белков.

На роль факторов стресс-сигнализации кроме выявленных стрессорных белков претендуют также внДНК, содержащиеся в плазме крови [10]. К настоящему времени уже установлено, что небольшие количества ДНК обнаруживаются и вне клеток, прежде всего в плазме крови. Циркулирующая ДНК может появляться в кровотоке в результате гибели ядросодержащих клеточных элементов, созревания эритроцитов и тромбоцитов путем некроза или апоптоза, а также активной секреции нуклеиновых кислот во внеклеточное пространство. Интерес к внеклеточной ДНК плазмы крови в настоящее время все более возрастает, что связано с прогностической и диагностической значимостью этого показателя при лучевом облучении, онкологических, аутоиммунных заболеваниях и др. Эта ДНК получила название внеклеточной ДНК (внДНК). Свойства и биологические функции фрагментов внДНК в норме и при патологии остаются малоизученными [11, 12].

В связи этим следующим этапом стало изучение наличия, уровня внДНК и частоты хромосомных aberrаций у людей подвергавшихся воздействию радиации и их возможная взаимосвязь. Чтобы определить, может ли внеклеточная ДНК быть фактором стресс-сигнализации при эффекте свидетеля в среду культивирования интактных лимфоцитов были добавлены внДНК, выделенные из плазмы крови здоровых доноров, облученной *invitro* 0,05 Гр дозой радиации и необлученной (таблица 3).

Таблица 3 – Изучение эффекта добавления внДНК из плазмы облученной крови к интактным лимфоцитам

Вариант	Клеток с aberrациями	Всего aberrаций	Хромосомного типа	Хроматидного типа
внДНК (контроль) + интактные лимфоциты	1,28±0,42	1,28±0,42	0,14±0,14	1,14±0,40
Интактные лимфоциты	1,00±0,44	1,00±0,44	0	1,00±0,44
Лимфоциты 0,05 Гр	4,40±0,92*	4,40±0,92*	2,00±0,63	2,40±0,63
внДНК(0,05Гр) + интактные лимфоциты	2,90±0,75	2,90±0,75	1,0±0,44	1,90±0,63
* p≤0,05.				

Цитогенетический анализ показал, что в результате введения в культуральную среду, к интактным лимфоцитам, внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы крови, облученной дозой 0,05 Гр γ -излучения в лимфоцитах-свидетелях (интактных лимфоцитах) эти фрагменты стимулируют развитие тех же реакций, что и в облученных клетках, т.е. наблюдается увеличение частоты хромосомных aberrаций, причем вне зависимости от концентрации внДНК в образце. В подтверждение этих результатов были проведены эксперименты по выделению внДНК из плазмы крови людей, профессионально контактирующих с ионизирующей радиацией, ликвидаторов ЧАЭС и изучению их влияния на интактные лимфоциты. Добавление внДНК, выделенной из плазмы крови *in vivo* облученных людей, в среду культивирования интактных лимфоцитов вызвало значительное увеличение частоты хромосомных aberrаций 3,02±0,32% и 2,91±0,51%, соответственно по сравнению с контрольным уровнем 1,00 ± 0,10% (p≤0,01). Полученные результаты свидетельствуют, во-первых, о наличии в плазме этих людей факторов стресс-сигнализации, которые могут сохраняться длительное время после облучения (ликвидаторы ЧАЭС облучились более 25 назад) и, во-вторых, что одной из составляющих этих факторов является внДНК. Полученные результаты согласуются с литературными данными, показывающими, что у ликвидаторов аварии на ЧАЭС повреждающие факторы в крови сохраняются в крови даже спустя более 20 лет после аварии [13]. Возможной причиной этого явления является то, что, как было показано нами, облучение крови

invitro, способствует значительному повышению кластогенной активности, и облученные клетки, проинкубированные в необлученной культуральной среде, продолжают выделять факторы стресс-сигнализации.

Анализ молекулярных масс фрагментов *внДНК* в культуральной среде или плазме облученной и необлученной крови показал, что количество и длина *внДНК* в облученных и необлученных образцах принципиально не отличается. Это означает, что ни концентрация, ни молекулярные веса фрагментов *внДНК* не являются маркерами радиационного воздействия. Но, тем не менее, как показано с помощью цитогенетических данных они оказывают стимулирующее воздействие на интактные лимфоциты. Все эти факты свидетельствуют, что, высвобождаемые фрагменты *внДНК* после облучения имеют определенную модификацию по сравнению с фрагментами *ДНК* необлученных образцов, что позволяет им быть факторами стресс-сигнализации и индуцировать в интактных клетках хромосомные аберрации. Например, проведенная оценка концентраций двух повторяющихся последовательностей генома - *ТОрДНК* и *СатIII* методом нерадиоактивной количественной гибридизации показала, что *внДНК* облученных доноров существенно обогащена фрагментами *ТОрДНК* по сравнению с *ядНК*, а содержание повтора *СатIII* во *внДНК* плазмы человека снижено по сравнению с содержанием этого повтора в *ядНК* [14]. Другими исследователями было показано, что содержание повторяющихся последовательностей генома в составе *вкДНК^R* по сравнению с *вкДНК^K* не отличается, т.е. не происходит существенного изменения состава последовательностей *вкДНК* после облучения лимфоцитов, в то же время они сообщают, что ответ лимфоцитов на действие ионизирующего излучения можно значительно изменить, изменив состав *вкДНК* в среде облученных клеток, например, путем введения последовательностей, содержащих *СрG-* повторы [15]. Таким образом, одним из механизмов принимающих участие в индукции эффекта свидетеля является усиленная экспрессия стрессорных белков и выделение *внДНК*, которые могут быть либо продуктом апоптоза, либо вновь синтезированными молекулами, либо *внДНК* с измененными свойствами [16].

Ряд литературных данных показывает, что возможным источником *внДНК* могут быть радиочувствительные клетки, гибнущие по механизму апоптоза. Т.е. фрагменты *внДНК*, переходящие в среду культивирования или плазму крови из апоптотических клеток могут быть одним из возможных компонентов, отвечающих за возникновение эффекта свидетеля. На связь апоптоза и эффекта свидетеля также указывают работы, в которых показано, что супрессоры апоптоза – ингибитор моноаминоксидазы и лактат могут эффективно ингибировать эффект свидетеля [17]. Исходя из этого ингибируя процесс апоптоза радиочувствительных клеток можно судить о его участии в процессе стресс-сигнализации.

Также в последние годы появляются данные о том, что фрагменты *ДНК* с определенными последовательностями при взаимодействии с соответствующими рецепторами клеток активируют белки семейства стресс-ассоциированных протеинкиназ. Тем более, что для развития в клетках-свидетелях аналогичных эффектов как в облученных клетках необходим контакт интактных клеток с факторами стресс-сигнализации, что может быть опосредовано клеточными рецепторами. Одним из возможных рецепторов для *внДНК* могут быть рецепторы *TLR9*, так как обнаружено увеличение *мРНК* этого рецептора и белка *MyD88* (основного проводника сигнала от *TLR9* к ядру) при окислительном стрессе, индуцированном радиацией в *G₀*-лимфоцитах [18]. В связи с этим, был рассмотрен возможный вариант стресс-сигнализации между облученными клетками и интактными лимфоцитами – апоптоз радиочувствительных клеток – образование *внДНК* – активация ими клеточных рецепторов *TLR9*.

Для проверки этого предположения проведен ряд экспериментов с блокировкой этих этапов стресс-сигнализации (таблица 4). Первый этап стресс-сигнализации – апоптотический останавливали введением в культуральную среду ингибитора активности каспазы 3 *Biotin-DEVD-FMK*. Второй – рецепторный – перекрывали блокированием *TLR9* путем добавления в среду хлорокина, который изменяет *pH* в эндосомах, где происходит взаимодействие *ДНК* с *TLR9*, а его изменение делает невозможным образование комплексов *ДНК* с рецепторами.

Культивирование интактных лимфоцитов в присутствии *внДНК*, которые были выделены из плазмы облученной крови, как уже было показано в предыдущих экспериментах, приводит к увеличению частоты хромосомных аберраций, как и при воздействии радиации в отличие от

Таблица 4 – Изменение частоты хромосомных aberrаций при изучении разных этапов стресс-сигналикации

Вариант	Клеток с aberrац.	Всего aberrаций	Хромосомного типа	Хроматидного типа
Инт. кл. (контроль)	1,00±0,37	1,00±0,37	0	1,00±0,37
Инт. кл. /2 Гр	26,00±1,66	26,00±1,66	16,00±1,38	10,00±1,13
Инт.кл+внДНК(к)	1,28±0,42	1,28±0,42*	0	
Инт.кл+внДНК(2 Гр)	7,00±0,96	8,00±1,02*	5,00±0,82	4,00±0,74
Инт.кл+ингиб. каспазы 3	1,20±0,41	1,20±0,41	0	1,20±0,41
Инт.кл+ингиб. каспазы 3+внДНК (2Гр)	3,20±0,66	3,20±0,66	1,20±0,41	2,00±0,53
Инт.кл+ингиб. каспазы 3 + внДНК (к)	1,50±0,46	1,50±0,46	0	1,50±0,46
Инткл (0,05Гр) + ингиб. каспазы 3/2 Гр	27,00±1,68	27,00±1,68	15,00±1,35	12,00±1,51
Инт.кл+хлорокин	1,30±0,37	1,30±0,37	0,14±0,14	1,16±0,40
Инт.кл+хлорокин+внДНК(2 Гр)	3,00±0,64	3,00±0,64	1,50±0,46	1,50±0,46
Инт.кл+хлорокин+внДНК(к)	1,20±0,41	1,20±0,41	0,14±0,14	1,06±0,39
*p≤0,01.				

внДНК из плазмы необлученной крови. Такой же результат наблюдается и при добавлении к интактным лимфоцитам внДНК, выделенной из плазмы облученных клеток, предварительно обработанных ингибитором каспазы 3, что свидетельствует о необходимости участия апоптоза в процессе стресс-сигналикации. Полученные результаты согласуются с данными ряда авторов - через 6 и 8 часов после облучения УФ светом лимфоцитов в дозе 1510 Дж/м² наблюдается статистически достоверное повышение уровня активности каспазы-3 [17].

Блокирование рецепторов TLR9 интактных клеток ингибитором – хлорокином не приводит к достоверному увеличению частоты хромосомных нарушений после добавления внДНК из плазмы облученной крови, что говорит об участии этих рецепторов в стресс-сигналикации. Однако тот факт, что увеличение частоты хромосомных aberrаций, тем не менее, происходит, позволяет предполагать существование других сигнальных путей развития адаптивного ответа и эффекта свидетеля. Артюхов, Наквасина и др (2009), полагают, что повышение уровня экспрессии Fas-рецепторов лимфоцитов через 4 и 5 часов после УФ-облучения связано не только с демаскированием ранее скрытых молекул Fas-рецепторов лимфоцитарных мембран, но и с синтезом их новых молекул, что свидетельствует о возможности реализации рецептор опосредованного пути апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия УФ-света [19]. Также не исключена возможность экскреции клетками новых последовательностей ДНК в ответ на облучение [20].

Модификация повреждений хромосом и эффекта свидетеля с помощью ингибиторов синтеза ДНК опосредованно, через определение частоты хромосомных aberrаций позволяет подтвердить или опровергнуть участие вновь синтезированных ДНК в его формировании. Воздействие ингибитора синтеза ДНК – оксимочевина (ОМ) на лимфоциты сразу после γ-излучения при формировании адаптивного ответа и эффекта свидетеля выявило подавление этих процессов (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние ингибитора синтеза ДНК (оксимочевина) на частоту хромосомных aberrаций и формирование адаптивного ответа

Вариант	Клеток с aberrациями	Всего aberrаций	Хромосомного типа	Хроматидного типа
Инт. кл. (контроль)	1,0±0,43	1,0±0,43	–	1,0±0,43
0,05 Гр	5,0± 0,80	5,0±0,80	3,0±0,43	2,0±1,69
2 Гр	25,0±1,37	31,0±1,46	21,0±1,29	10,0±0,95
0,05 / 2 Гр	16,0± 1,19	17,7±1,23	13,1 ± 1,10	4,6± 0,66
0,05 Гр + ОМ	10,0±1,73	11,0±1,80	6,0±1,37	5,0±1,25
0,05 ОМ / 2 Гр	22,0±2,39	30,0±2,64	21,0±2,35	9,0±1,65
Интактн. кл + ОМ	2,5±0,90	2,5±0,90	0,5±0,40	2,0±0,80
Инт.кл+внДНК(2Гр) + ОМ	2,0±1,69	2,0±1,69	–	2,0±1,69

Описанные цитогенетические данные о влиянии ингибитора синтеза ДНК на радиационно-индуцированный эффект свидетеля и адаптивный ответ дают почву для предположения, что фрагменты ДНК, которые обнаруживаются в среде культивирования или в плазме облученных клеток могут секретироваться в среду живыми, нормально функционирующими клетками.

Таким образом, в ходе данного исследования показано, что внеклеточная ДНК, источником которой вероятно служат погибшие вследствие апоптоза радиочувствительные клетки, является одним из компонентов факторов стресс-сигнализации в реализации эффекта свидетеля, вызванного действием ионизирующей радиации в малой дозе, которые могут быть либо продуктом апоптоза, либо вновь синтезированными молекулами, либо вДНК с измененными свойствами.

Источник финансирования исследований. Работа была выполнена в рамках Гранта 3765/ГФ4 по теме: «Моделирование динамической системы обобщенных цитогенетических показателей для оценки последствий радиационного воздействия на человека», финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан» на 2015–2017 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ермаков А.В., Костюк С.В., Егорова Н.А., Малиновская Е.М., Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. Фрагменты ДНК, обнаруживаемые в среде культивирования после воздействия ионизирующей радиации в адаптирующих дозах, являются фактором стресс-сигнализации между лимфоцитами и клетками –свидетелями // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2007. - Т. 47, №2. - С. 133-140.
- [2] Simon H, Kai R. (2011) Candidate protein biomarkers as rapid indicators of radiation exposure, Radiation Measurements, 9:903-906. DOI:10.1016/j.radmeas.2011.02.001
- [3] Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В., Вейко Н.Н. ДНК-сигнальный путь, обеспечивающий развитие радиационного эффекта свидетеля в клетках человека // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2011. - Т.51, Вып. 6. - С. 651-659.
- [4] Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ. (1960) Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood, Experimental Cell Research, 20: 613-616. DOI:10.1016/0014-4827(60)90138-5
- [5] Плохинский Н.А. Алгоритмы в биометрии. - 1967. - 82 с.
- [6] Osterreicher J, Prise KM, Michael BD, Vogt J, Butz T, Tanner JM. (2003) Radiation-induced bystander effects. Mechanisms, biological implications, and current investigations at the Leipzig LIPSION facility, Strahlenther und Onkologie. 2:69-77. DOI: 10.1007 / s00066-003-1000-9
- [7] Balajee AS, Ponnaiya B, Baskar R, Geard CR (2004) Induction of replication protein a in bystander cells, Radiation Research Society, 6:677–686. DOI: <http://dx.doi.org/10.1667/RR3269>
- [8] Чердниченко О.Г. Индукция белков в плазме крови человека при формировании адаптивного ответа Известия НАН РК. Серия биологическая 2006 № 4 с 66-71
- [9] Голуб Е.В., Севаньяев А.В. Влияние ингибиторов синтеза ДНК и белка на выход aberrаций хромосом в культуре лимфоцитов человека при γ - и нейтронном облучении в различных стадиях митотического цикла. Цитогенетические эффекты в стадии G1 // Радиационная биология. Радиоэкология. -1995. - № 6. -С. 730-735.
- [10] Конькова М.С. Внеклеточная ДНК фактор сигнализации при радиационном эффекте свидетеля: автореф. . . . канд. биол. наук. - М., 2011. - 21 с.
- [11] Туаева Н.О., Абрамова З.И., Мустафина Д.М. Внеклеточная ДНК в кровотоке человека. II. Биологическая роль внеклеточной ДНК. // Учебные записки Казанского государственного университета. - 2008. - Т. 150, №2. - С. 59-70
- [12] Костюк С.В., Алексеева А.Ю., Конькова М.С., Смирнова Т.Д., Ермаков А.В., Ефремова Л.В., Конорова И.Л., Вейко Н.Н. Внеклеточная ДНК влияет на функциональную активность клеток эндотелия. // Медицинская генетика. - 2010. - №1. - С. 38-46.
- [13] Морозник П.М., Моссе И.Б., Мельнов С.Б., Морозик М.С., Сеймур К.Б., Мазерсилл К.Е. Генетические эффекты «Байстэндер» факторов из сыворотки крови людей, облученных в результате аварии на ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2011. - Т. 51, № 1. - С. 76-80.
- [14] Костюк С.В., Вейко Н.Н., Калапникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Иванова С.М., Рязанцева Т.А., Сперанский А.И. Периферическая кровь здоровых доноров содержит антитела к фрагментам ДНК рибосомного повтора человека (ТОРДНК) // Аллергология и иммунология: материалы 6 съезда аллергологов и иммунологов СНГ. - 2006. - Т.7, №3. - С.254.
- [15] Ермаков А.В., Конькова М.С., Костюк С.В., Калапникова Е.А., Кокаровцева С.Н., Егорова Н.А., Вейко Н.Н. СрG-ДНК ингибирует клеточные реакции, сопровождающие развитие адаптивного ответа в лимфоцитах человека после воздействия рентгеновского излучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2009. - Т. 49. - №1. - С.34-41.
- [16] Костюк С.В., Замулаева И.А., Агпова Р.К., Ермаков А.В., Саенко А.С., Орлова Н.В., Смирнова С.Г., Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. Изменение свойств внеклеточной ДНК периферической крови и частоты TCR-мутантных клеток при действии на организм человека ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. -2008. Т. 48, № 1. - С. 5-13.

- [17] Seymour CB, Mothersill C, Mooney R, Moriarty M, Tipton KF. (2003) Monoamine oxidase inhibitors l-deprenyl and clorgyline protect nonmalignant human cells from ionising radiation and chemotherapy toxicity, *British Journal of Cancer*, 89:1979–1986. DOI: 10.1038 / sj.bjc.6601361
- [18] Stacey K, Young G, Clark F, Sester DP, Roberts TL, Naik S, Sweet MJ Hume DA. (2003) The Molecular Basis for the Lack of Immunostimulatory Activity of Vertebrate DNA, *Immunology*, 170:3614–3620. DOI: 10.4049 / jimmunol.70.7.3614
- [19] Артюхов В.Г., Наквасина М.А., Трубицына М.С., Попова Т.Н., Искусных И.Ю. Рецепторные каспазозависимый и каспазозависимый пути апоптоза, индуцированного УФ-излучением в лимфоцитах человека // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2009. – Т. 49, № 4. – С. 432–437.
- [20] Борейко А.В., Чаусов В.Н., Красавин А., Ривначка И., Стукова С.И. Влияние ингибиторов синтеза ДНК на индукцию и репарацию двунигетевых разрывов ДНК в лимфоцитах человека при действии излучений с разной ЛПЭ // *Письма в ЭЧАЯ*. – 2011. – Т. 8, № 4(167). – С. 670–678.

REFERENCES

- [1] Ermakov AV, Kostiuk SV, Egolina NA, Malinovskaia EM, Veiko NN, Spitkovskii DM (2007) DNA fragments found in the culture medium after exposure to ionizing radiation in the adapting doses are a stress signaling factor between lymphocytes and scaffold cells // *Radiation Biology. Radioecology [Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 2:133–140. (In Russian)
- [2] Simon H, Kai R. (2011) Candidate protein biomarkers as rapid indicators of radiation exposure, *Radiation Measurements*, 9:903–906. DOI:10.1016/ j.radmeas.2011.02.001
- [3] Ermakov AV, Kon'kova MS, Kostiuk SV, Veiko NN (2011) "DNA-signaling" pathway, ensuring the development of the radiation effect of a witness in human cells // *Radiation Biology. Radioecology Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 6:651–659. (In Russian)
- [4] Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ. (1960) Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood, *Experimental Cell Research*, 20: 613–616. DOI:10.1016/0014-4827(60)90138-5
- [5] Plokhinskii NA (1967) Algorithms biometrics [Algoritmy biometrii]. Moscow, Russia. ISBN 1702060000. (In Russian)
- [6] Osterreicher J, Prise KM, Michael BD, Vogt J, Butz T, Tanner JM (2003) Radiation-induced bystander effects. Mechanisms, biological implications, and current investigations at the Leipzig LIPSION facility, *Strahlenther und Onkologie*. 2:69–77. DOI: 10.1007 / s00066-003-1000-9
- [7] Balajee AS, Ponnaiya B, Baskar R Geard CR (2004) Induction of replication protein a in bystander cells, *Radiation Research Society*, 6:677–686. DOI: http://dx.doi.org/10.1667/RR3269
- [8] Cherednichenko OG (2006) Induction of proteins in human plasma in the formation of an adaptive response // *Proceedings of National Academy of Sciences of Kazakhstan. A series of biological [Izvestiia NAN RK.Seriia biologicheskaiia]* 4:66–71. (In Russian)
- [9] Golub EV, Sevankaev AV (1995) Effect of inhibitors of DNA and protein synthesis on the yield of chromosome aberrations in human lymphocyte culture under gamma and neutron irradiation in various stages of the mitotic cycle. Cytogenetic effects in stage G1 // *Radiation Biology. Radioecology [Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 6:730–735. (In Russian)
- [10] Konkova MS (2011) Extracellular DNA signaling factor in radiation bystander effect: Abstract PHD [Avtoref. . . kand.biol.nauk]. Moscow, Russia. (In Russian)
- [11] Tuaeua NO, Abramova ZI, Mustafina DM (2008) Extracellular DNA in the bloodstream of a person. II. The biological role of extracellular DNA // *Educational notes of the Kazan State University [Uchebnye zapiski Kazanskogo gosudarstvenno universiteta]* 2: 59–70. (In Russian)
- [12] Kostiuk CB, Alexeyev AY, Konkova MS, Smirnova TD, Ermakov AB, Yefremov LV, Konorova IL, Veiko HH (2010) Extracellular DNA affects the functional activity of endothelial cells // *Medical Genetics [Meditsinskaiia genetika]* 1: 38–46. (In Russian)
- [13] Moroznik PM, Mosse IB, Melnov SB, Morozik MS, Seymour CB, Mothersill KE (2011) Genetic effects of the " bystander " factors from blood serum of people irradiated as a result of the Chernobyl accident *Radiation Biology. Radioecology [Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 1: 76–80. (In Russian)
- [14] Kostiuk SV, Veiko NN, Kalashnikova EA, Kokarovtseva SN, Ivanova SM, Riazantseva TA, Speranskii AI (2006) The peripheral blood of healthy donors contains antibodies to DNA fragments of human ribosomal repetition (TOP/DHK) // *Allergology and Immunology [Allergologiiia immunologiiia]* 3:254. (In Russian)
- [15] Ermakov AV, Kon'kova MS, Kostiuk SB, Kalashnikova EA, Kokarovtseva SN, Egolina NA, Veiko NN (2009) CpG-DHK inhibits cellular reactions accompanying the development of an adaptive response in human lymphocytes after exposure to low-dose X-rays // *Radiation Biology. Radioecology [Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 1:34–41. (In Russian)
- [16] Kostiuk SV, Zamulaeva IA, Agapova RK, Ermakov AV, Saenko AS, Orlova NV, Smirnova SG, Veiko NN, Spitkovskii DM (2008) Change in the properties of the extracellular DNA of peripheral blood and the frequency of TCR mutant cells under the action of ionizing radiation on the human body // *Radiation Biology. Radioecology [Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 1:5–13. (In Russian)
- [17] Seymour CB, Mothersill C, Mooney R, Moriarty M, Tipton KF. (2003) Monoamine oxidase inhibitors l-deprenyl and clorgyline protect nonmalignant human cells from ionising radiation and chemotherapy toxicity, *British Journal of Cancer*, 89:1979–1986. DOI: 10.1038 / sj.bjc.6601361
- [18] Stacey K, Young G, Clark F, Sester DP, Roberts TL, Naik S, Sweet MJ Hume DA. (2003) The Molecular Basis for the Lack of Immunostimulatory Activity of Vertebrate DNA, *Immunology*, 170:3614–3620. DOI: 10.4049 / jimmunol.70.7.3614
- [19] Artiukhov VG, Nakvasina MA, Trubitsyna MS, Popova TN, Iskusnykh IIu (2009) Receptor caspase-dependent and non-pathogen dependent pathways of apoptosis induced by UV radiation in human lymphocytes // *Radiation Biology. Radioecology [Radiatsionnaia biologiiia.Radioekologiiia]* 4: 432–437. (In Russian)

[20] Boreiko AV, Chaurov VN, Krasavin A, Rivnachka I, Stukova SI (2011) Effect of DNA synthesis inhibitors on the induction and repair of double-stranded DNA ruptures in human lymphocytes under the action of radiation with different LET// Writing in the journal "Physics of Elementary Particles and Atomic Nuclei" [Pis'ma v zhurnal "Fizika elementarnykh chastits i atomnogo iadra"]4(167):670-678. (In Russian)

О. Г. Чердниченко, А. Л. Пилпогина

Жалпы генетика және цитология институты, Алматы, Қазақстан

АДАМНЫҢ СӘУЛЕЛЕНУГЕ ҰШЫРАҒАН ЖӘНЕ ҰШЫРАМАҒАН ЛИМФОЦИТ КЛЕТКАЛАРЫНЫҢ АРАСЫНДАҒЫ СТРЕСС-СИГНАЛИЗАЦИЯ

Аннотация. Аз мөлшерлі мутагенді факторлардың әсерінен бейімделу жауабының түзілуі қалыптасады және алдын-ала радиациялық сәулелермен өңделген лимфоцит жасушаларын өңделмеген жасушалармен араластырғанда сәулеленген жасушалар өзіндегі сәулелі стресс-сигналды интактылы жасушаларға береді. Мұндай қасиеттің көрінуіне апоптоз процесінің өнімдері, немесе қайта синтезделген молекулалар, немесе жасушаішілік ДНҚ молекуласының өзгерген жағдайынан пайда болатын стресске жауапты ақуыздар мен жасушаішілік ДНҚ молекуласы себепті болатыны анықталды. Осы нәтижелер негізінде стрестің туындауына мынадай болжам жасалды: сәулеленген және интактылы лимфоцит жасушалары арасында ақпарат алмасу – радиосезімтал жасушалардың апоптозы – жасушаішілік ДНҚ молекуласының пайда болуы – TLR9 жасуша рецепторының активтілігі. Сигналды жолдың бірінші апоптоздық кезеңі қоректік ортаға каспазы 3-Biotin-DEVD-FMK кешенін қосу арқылы тоқтатылды. Екінші кезең – рецепторлы, яғни қоректік ортаға хлорокинді қосу арқылы TLR9 геніне тосқауыл қоя отырып жүргізілді. Бұл өз кезегінде эндосомадағы pH көрсеткішін өзгертеді және ДНҚ молекуласы мен TLR9 байланыса отырып сол ДНҚ молекуласының рецепторлармен байланысуын болдырмайды. Адамның сәулеленген және интактылы лимфоциттері арасындағы стресс-сигналды сатыларының апоптоз ингибиторлары мен рецепторлы кезеңдерінің өзгерісі (модификация) сәулеленген жасушалардағы ақпараттар интактылы жасушаларға жасушаішілік ДНҚ арқылы берілетіндігін көрсетті және олар TLR9 және басқа да рецепторлар арқылы радиосезімтал жасушаларының апоптозы кезінде бөлініп шығады. Сондай-ақ ДНҚ синтезін оксимочевина арқылы ингибирлеу сәулеленген жасушалар плазмасында немесе қоректік ортада жасушаішілік ДНҚ молекуласы фрагменттерінің болатынын көрсетті.

Түйін сөздер: «bystander» әсер, бейімделу жауабы, жасушадан тыс ДНҚ, стресс-сигнал, хромосомалық абберрациялар, радиосезімталдылық.