

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

P19-2000-245

Е.А.Красавин, Р.Д.Говорун

РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
В ОИЯИ

Направлено в оргкомитет Сунгульской конференции,
Снежинск, 24–26 августа 2000 г.

2000

Решение сессии ЮНЕСКО о включении юбилея Н. В. Тимофеева-Ресовского в число памятных дат является мировым признанием роли и вклада деятельности этого выдающегося русского ученого. Сунгульская конференция открывает череду научных форумов, посвященных 100-летию со дня рождения Н. В. Тимофеева-Ресовского: в сентябре состоится международная конференция в Дубне (под Москвой), в октябре - в Минске (Белоруссия), в ноябре - в Москве.

Почему эта дата широко отмечается в Объединенном институте ядерных исследований в Дубне? Как известно, деятельность Н. В. Тимофеева-Ресовского проходила в весьма сложной и специфической обстановке. После окончания войны продолжалась кампания дискредитации генетики, а печально известная сессия ВАСХНИЛ (в августе 1948 года) довершила гонения на ученых-генетиков и, по сути дела, привела к ликвидации крупнейшей в мире, наряду с американской, русской школы генетиков. Но ... уже прогремели ядерные взрывы в Хиросиме и Нагасаки, начались ядерные испытания в СССР и становилось ясно, что, помимо чудовищной разрушительной силы, возникающая при этом радиация оказывает пагубное действие на человека и все живые организмы, в жизнь вошел термин «лучевая болезнь». Встала проблема исследования воздействия на биологические объекты ионизирующих излучений, изучения острых и отдаленных, в том числе генетических, последствий облучения. Такие исследования были начаты в различных ядерных центрах: в Курчатовском институте, в Обнинске, в последующем в Дубне. И первым в этом списке был центр на Южном Урале (Сунгуль), где с весны 1947 года Н. В. Тимофеев-Ресовский возглавлял биологическую лабораторию.

Что касается ядерного центра в Дубне, то, по-видимому, началом проведения радиобиологических исследований следует считать 1956 год, когда он был преобразован в Объединенный институт ядерных исследований, ставший международным центром фундаментальных работ по ядерной физике. Вскоре были начаты подготовительные работы, связанные с осуществлением радиобиологических экспериментов на ускорителях ОИЯИ. Они были инициированы специалистами, которые готовили первые космические полеты. После запуска первого искусственного спутника Земли в открытом космическом пространстве были обнаружены разные виды ионизирующих излучений: генерируемые Солнцем главным образом протоны высоких энергий, а также разные виды высокоэнергетичных многозарядных ионов.

Уже при подготовке первых полетов биологических объектов (собаки) специалисты начали задумываться о том, как будут вести себя живые орга-

низмы в таких условиях. Чтобы готовить и успешно осуществлять пилотируемые полеты человека в Космос, естественно, надо было изучить влияние таких видов излучений на живые организмы. Для того чтобы понять специфику воздействия высокоэнергетичных протонов на живой организм, надо было смоделировать его в наземных условиях. И это можно было сделать в тот период только в Дубне. Дело в том, что в Дубне был построен и в 1949 году запущен в эксплуатацию первый 6-метровый ускоритель протонов на энергию 660 МэВ и получен выведенный из ускорителя коллимированный пучок протонов. Высокоэнергетичные протоны, обнаруженные в Космосе, имеют широкий энергетический спектр, но максимальный вклад составляют протоны с энергиями в этом диапазоне. И протонный ускоритель можно было использовать для моделирования радиационного воздействия на живые организмы протонов космического пространства, что и было выполнено биологами и физиками ряда исследовательских институтов Москвы (а с 1964 года в Дубне работает на постоянной основе лаборатория Института медико-биологических проблем). В 60-е годы в ОИЯИ были проведены широкомасштабные радиобиологические эксперименты, которые позволили установить так называемую относительную биологическую эффективность (ОБЭ) протонов высоких энергий по сравнению с воздействием электромагнитных видов излучения (рентгеновские и γ -лучи). Результаты этих работ позволили дать соответствующие рекомендации для тех институтов, которые занимались планированием и осуществлением пилотируемых полетов человека в космическом пространстве.

В настоящее время радиобиологические и радиационно-генетические исследования продолжают и ведутся уже непосредственно в ОИЯИ, где более 20 лет назад в Лаборатории ядерных проблем, руководимой чл.-корр. АН СССР В. П. Джелеповым, было создано структурное подразделение — сектор биологических исследований из радиобиологов, радиационных генетиков и физиков, работавших над этими проблемами. Его возглавил в прошлом сотрудник и ученик Н. В. Тимофеева-Ресовского проф. Владимир Иванович Корогодин. И с этого времени в нашу жизнь прочно вошло имя Н. В. Тимофеева-Ресовского. В кабинете В. И. Корогодина входящего встречает взгляд Николая Владимировича с портрета над рабочим столом В. И. Корогодина. Сам Н. В. Тимофеев-Ресовский дважды приезжал в Дубну, выступал с докладами на Школе по молекулярной биологии, которая проходила на территории ОИЯИ, и в Доме ученых, где состоялась широкая встреча с учеными Института, тепло его приветствовавшими. Сектор биологических исследований быстро перерос в отдел, а в последующем был преобразован в самостоятельное структурное подразделение ОИЯИ — Отделение радиационных и радиобиологических исследований (возглавляет проф. Е. А. Красавин). В его отделах проводятся исследования взаимодействия разных видов ионизирующих излучений с веществом, ведется мониторинг радиационной обстановки на ускорителях и реакторах Института, в городе, осуществляется индивидуальный дозиметрический контроль за персоналом.

Далее кратко рассмотрим спектр тех задач и проблем, которые решают специалисты в отделе радиобиологии.

ОИЯИ располагает уникальными ускорителями и установками, доступными для проведения радиобиологических экспериментов: фазотрон, который генерирует протоны с энергией 660 МэВ; ускорители многозарядных ионов У-200, У-300, У-400М (практически вся таблица Менделеева вплоть до урана может быть представлена в пучках этих ускорителей); синхрофазотрон, который может ускорять протоны и тяжелые ионы до релятивистских энергий в ~ 10 ГэВ/нуклон. Несколько месяцев назад запущен новый ускоритель со сверхпроводящими магнитами - нуклотрон, который также ускоряет различные типы частиц до релятивистских энергий. Эти ускорители позволяют проводить ширококомасштабные радиобиологические и радиационно-генетические эксперименты.

Исходя из такой специфики Института, естественно, главной задачей, которая была поставлена примерно четверть века назад при организации такого рода работ, было решение проблемы ОБЭ разных видов ионизирующих излучений. Это одна из старых проблем радиобиологии. Еще с 40-х годов, когда были построены первые реакторы, а в последующем ускорители заряженных частиц, радиобиологами было обнаружено, что корпускулярные виды излучений (нейтроны, ускоренные многозарядные частицы) по сравнению с электромагнитным излучением обладают более выраженным поражающим действием в одинаковых дозах на различные биологические объекты. Было ясно, что в основе различий лежат какие-то глубокие внутренние процессы и закономерности, которые необходимо выявлять. Это фундаментальный аспект проблемы, а прикладной аспект состоял в том, что нужно было нормировать воздействие разных видов излучений на организм в условиях работы в смешанных полях излучений.

Эта проблема решалась во многих лабораториях мира. Но решение шло с использованием только физических подходов: учета специфики энерговыделения разных видов ионизирующих излучений в некоторых микрообъемах, которые соответствуют определенным генетическим структурам в клетке, и соответствующих расчетов выхода повреждений (к этому времени были уже развиты методы Монте-Карло, разные микродозиметрические методики, направленные на ее решение). Но оказалось, что решить эту проблему только с физических позиций невозможно. Оказалось, что биологическая эффективность излучений с разными физическими характеристиками определяется не только физическим, но и биологическим фактором: решающая роль принадлежит свойству клеток восстанавливаться от лучевых повреждений [1,2]. Накапливавшиеся данные по открытому к этому времени пострадиационному восстановлению клеток от повреждений приводили к предположению, что на величину ОБЭ разных видов излучений оказывают влияние не только физические свойства этих излучений, но и способность клеток репарировать лучевые повреждения ДНК [2-4]. Для решения этих вопросов были использованы разные виды ионизирующих излучений в широком интервале значений линейной передачи энергии (ЛПЭ) и биологические объекты, способные и неспособные к пострадиационному восстановлению, а также методы, позволяющие выключать разные пути репарации клеточной ДНК. Основные исследования были проведены на бактериальных клетках, так как у них были

детально изучены все аспекты структурно-функциональной организации генетического аппарата и основные этапы репарационного процесса.

Влияние репарации на биологическую эффективность разных видов ионизирующих излучений хорошо видно из рис.1, где приведена зависимость радиочувствительности (оценка по выживаемости) трех штаммов бактерий *Escherichia coli* от ЛПЭ излучений: для клеток дикого типа, клеток с выключенной системой репарации медленного типа (гес А-мутант) и клеток, интенсивно репарирующих повреждения ДНК (Gam^r-мутант). При действии излучений электромагнитной природы (γ -лучи) и ускоренных частиц в диапазоне ЛПЭ до ~ 10 кэВ/мкм радиочувствительность очень сильно меняется в зависимости от репарационного статуса клеток, но при облучении плотнoионизирующими частицами с возрастающими ЛПЭ происходит нивелирование радиочувствительности всех штаммов бактерий при ЛПЭ в диапазоне около 100 кэВ/мкм и более. Таким образом, у клеток с высокой способностью к репарации повреждений ДНК относительная биологическая эффективность излучений (по сравнению с воздействием γ -лучей) возрастает с увеличением ЛПЭ до ~ 100 кэВ/мкм, а у клеток с дефектами репарации она оказывается сниженной.

Увеличение радиочувствительности при воздействии редкоионизирующих излучений наблюдалось (рис.2) и у клеток млекопитающих (клетки китайского хомячка) в присутствии арабинозидцитозина (AraC), который на-

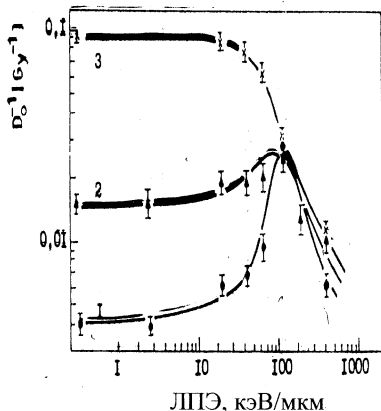


Рис.1. Зависимость радиочувствительности (D_0^{-1}) различных штаммов бактерий *Escherichia coli* от ЛПЭ излучений: 1 – Gam^r-мутант, 2 – клетки дикого типа, 3 – гес А-мутант

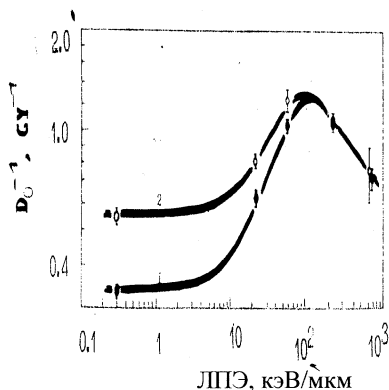


Рис. 2. Зависимость радиочувствительности (D_0^{-1}) клеток китайского хомячка от ЛПЭ излучений при разных условиях культивирования: 1 – оптимальные условия, 2 – в присутствии ингибитора репарации ДНК

рушает репарацию ДНК, являясь ингибитором ДНК-полимеразы [5-7]. В этом случае вследствие длительного сохранения брешей на поврежденной нити ДНК повышалась вероятность возникновения разрыва оппозитной нити в результате ее атаки ферментами типа эндонуклеаза s_1 и образования так называемых энзиматических двунитевых разрывов (ДР) ДНК. Поскольку при воздействии плотноионизирующими излучениями увеличивается выход прямых ДР ДНК, то различия в радиочувствительности клеток в присутствии Арац и без него уменьшались, нивелирование наблюдалось при значениях ЛПЭ ~ 100 кэВ/мкм и более, как и у бактерий. При этом нарушение процессов репарации ДНК в клетках млекопитающих сопровождалось снижением коэффициентов ОБЭ с ростом ЛПЭ.

В последующем и до настоящего времени работа подразделения сконцентрирована на исследовании мутагенного действия излучений разного качества, с разными физическими характеристиками, особенностей образования различного рода мутаций в живых клетках и их последствий [8].

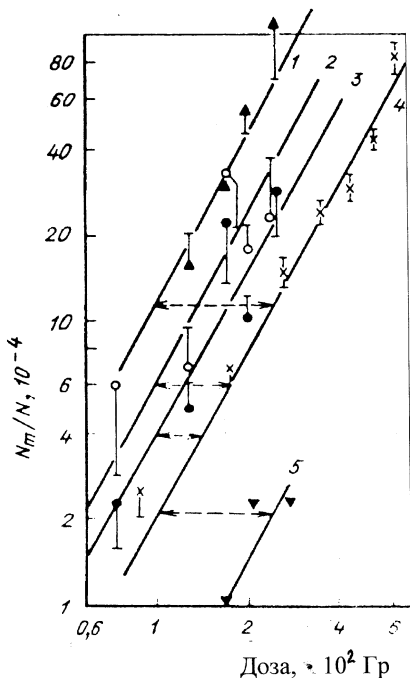


Рис. 3. Зависимость частоты мутирования клеток *E. coli* от дозы облучения разными типами излучений (в логарифмическом масштабе): 1 — ионы гелия (22 кэВ/мкм); 2 — ионы гелия (54 кэВ/мкм); 3 — ионы гелия (72 кэВ/мкм); 4 — γ -лучи ^{137}Cs ; 5 — ионы углерода (220 кэВ/мкм)

исследуются генные (или точковые) мутации, связанные с модификацией оснований в ДНК бактериальных и дрожжевых клеток, что приводит к нарушениям генетического кода; и структурные мутации, связанные с повреждением обеих нитей ДНК и возникновением хромосомных нарушений в клетках млекопитающих и человека. На рис.3 приведена индукция мутаций одного из генов в *E. coli* при воздействии γ -лучей и ускоренных ионов с разной ЛПЭ. Как видим, в некотором диапазоне ЛПЭ тяжелые ионы оказывают более выраженное мутагенное действие по сравнению с γ -излучением. Наблюдается весьма интересное явление [9]. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучений по критериям летального действия и индукции мутаций описывается кривыми с локальным максимумом (рис.4), однако максимум для индукции мутаций сдвигается к меньшим значениям ЛПЭ (~ 20 кэВ/мкм) по сравнению с летальным эффектом (~ 100 кэВ/мкм). Это связано со спецификой тех молекулярных на-

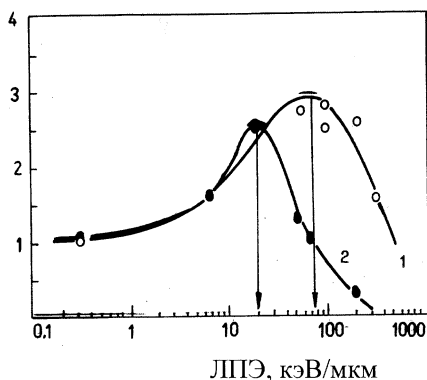


Рис. 4. Зависимость ОБЭ тяжелых ионов от ЛПЭ: 1 — по летальному эффекту, 2 — по индукции *lac*⁻ мутаций в клетках бактерий *Escherichia coli*

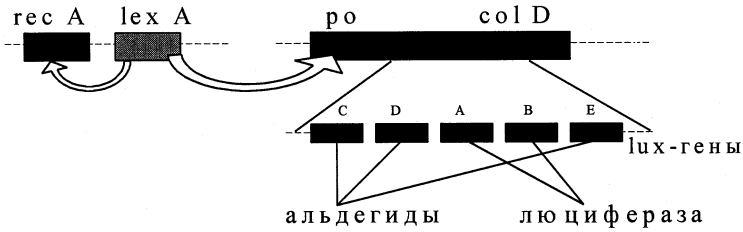
впоследствии, она существует и в клетках эукариотического типа [10]. Она представлена двумя ключевыми генами — *rec A* и *lex A*. Ген *rec A* кодирует синтез одного уникального белка, обладающего многими функциями (в том числе связанной с генетической рекомбинацией). Продукт гена *lex A* является репрессором, запирающим синтез *rec A*-гена, свой собственный синтез и синтез более 20 других различных генов. При возникновении в клетке повреждения ДНК кластерного типа *rec A*-белок (конститутивный уровень его присутствует в клетке) взаимодействует с этим повреждением и приобретает свойство расщеплять другие белки, в том числе этот репрессор. И чем сложнее повреждение, тем интенсивнее начинает экспрессировать этот ген, и при осуществлении различных репарационных событий возникающие при этом ошибки могут закрепиться как мутации.

На базе этой SOS-системы оказалось возможным сконструировать весьма полезную в практическом плане тест-систему — так называемый «SOS-lux-тест», для генетического *on-line* мониторинга в целях обнаружения в окружающей среде либо оценки влияния какого-либо агента на генетический аппарат живых клеток [11]. Эта работа выполнялась в рамках Международного проекта «SOS-lux-test COPERNICUS». Данный метод основан на использовании клеток *E. coli* с высококопийной плазмидой PPLS-1, несущей гены люциферазного оперона люминесцентной бактерии *Photobacterium loeoghathi* под промотором колицинового *sda*-гена из Col D-CA23-плазмиды (рис.5). Дело в том, что *lux*-гены катализируют одну биохимическую реакцию, идущую с высветкой квантов света в видимой области (490 нм). Эти гены введены под контроль *lex A*-репрессора, соответственно, свечение бактериальных клеток находится под его контролем, и в норме эти клетки молчат, не светятся. Но при повреждении ДНК какими-либо мутагенными и канцерогенными агентами в процессе SOS-репарации происходит дерепрессия всех этих генов и

рушений, которые лежат в их основе — это ДР ДНК при летальном воздействии и множественные (так называемые кластерные) повреждения одной нити ДНК при мутагенезе.

Многочисленные эксперименты на бактериальных клетках с разным репарационным статусом выявили, что, оказывается, решающим условием возникновения мутаций является наличие в бактериальных клетках специфической, так называемой мутагенной, системы репарации — SOS-репарации (как выяснилось

1. Стабильное состояние



2. Репарация ДНК и другие SOS-функции

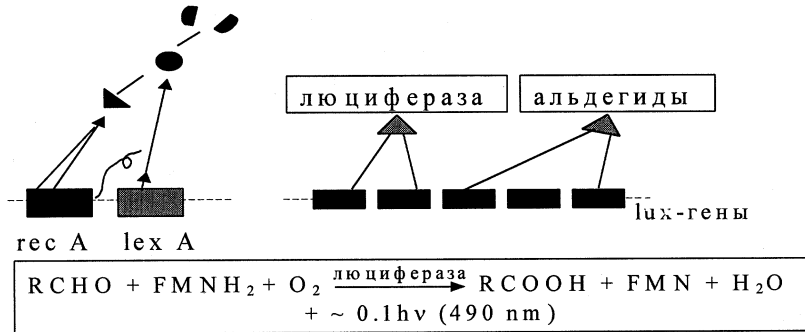


Рис. 5. Схема "SOS-lux-теста" (пояснения в тексте)

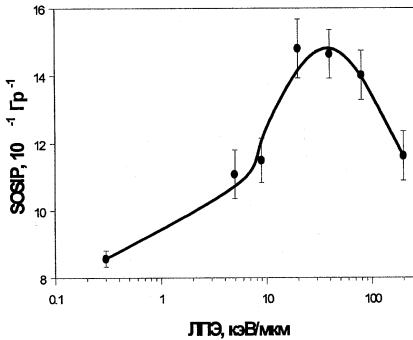


Рис. 6. Зависимость SOS-ответа клеток (SOSIP) от ЛПЭ излучений

клетки начинают светиться. С помощью люциметра можно количественно оценивать интенсивность такого свечения, измеряя ее в числе импульсов (под действием света ток в фотодиоде преобразуется в импульсы). С помощью этой системы оказалось возможным изучить зависимость интенсивности SOS-ответа клеток от ЛПЭ заряженных частиц. Было показано (рис.6), что с ростом ЛПЭ излучений интенсивность SOS-реакции клеток повышается и коррелирует с возрастанием мутагенной эффективности частиц [8].

Исследование закономерностей мутационного процесса при действии ионизирующих излучений на клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показало, что γ -излучение эффективно индуцирует все шесть типов замен пар ос-

нований в ДНК [12]. При этом зависимость частоты точковых мутаций от дозы облучения у гаплоидных клеток описывается линейной функцией, в то время как для диплоидных клеток она является линейно-квадратичной. Спектр замен пар оснований у гаплоидных и диплоидных дрожжей идентичен. Как известно, при повреждении ДНК в клетках запускается адаптивный ответ, включающий остановку клеточного цикла, обеспечивающую время для репарации возникших повреждений. Процесс осуществляется механизмом негативного контроля, названным *checkpoint*. При изучении у дрожжей генетического контроля *checkpoint*-регуляции было идентифицировано три новых гена SRM5, SRM8 и SRM12 и показано их участие в *checkpoint*-контроле [13,14]. Особенно важное значение имеет прямое доказательство участия кодируемой геном SRM5 протеинкиназы p34, играющей центральную роль в регуляции клеточного цикла и являющейся, по-видимому, мишенью передачи сигнала о повреждении ДНК-машинерии, обеспечивающей прохождение клеточного цикла.

Возможность исследования мутаций в клетках млекопитающих и человека появилась немногим более 10 лет назад, когда были разработаны тест-системы, основанные на некоторых биохимических процессах в клетках [15]. Они позволяют выявлять мутации ряда генов — HPRT, APRT, TK и др. Закономерности и механизмы мутагенного действия излучений с разной ЛПЭ на клетки высших эукариот изучены крайне слабо. Нами исследуется индукция мутаций в локусе HPRT, расположенном в X-хромосоме. Он кодирует фермент гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу, катализирующий реакцию конденсации пуринов гуанина и гипоксантина с 5'-фосфорибозил-1-пирофосфатом с образованием соответствующих нуклеотидов, утилизируемых при синтезе ДНК. Селективная схема для выявления HPRT-мутантов основана на том, что клетки, синтезирующие этот фермент, способны включать токсичный аналог пуриновых оснований — 6-тиогуанин, что приводит к ингибированию их роста и гибели. Мутантные клетки, у которых отсутствует (или ослаблена) активность HPRT-гена, теряют эту способность и в селективной среде с 6-тиогуанином проявляют резистентность к нему, выживают и образуют колонии, которые можно количественно учесть, выделить и проводить другие исследования уже мутантных клеток.

На рис. 7 приведены дозовые кривые выживаемости клеток китайского хомячка V-79 и частоты мутаций, нормированные на выжившие клетки, после γ -облучения и действия ускоренных ионов гелия и углерода с ЛПЭ в диапазоне 20–367 кэВ/мкм [16]. С ростом ЛПЭ излучений изменяется форма кривых: для выживаемости — сигмондные кривые модифицируются в экспоненциальные, а для индукции мутаций — линейно-квадратичные кривые — в линейные при ЛПЭ ~ 78 кэВ/мкм и более. Как видно на рис. 8, зависимости ОБЭ от ЛПЭ тяжелых ионов описываются кривыми с локальным максимумом в области около 100 кэВ/мкм. ОБЭ по мутагенному эффекту более чем в 2 раза превышает ОБЭ по выживаемости клеток. Здесь приведена также кривая по индукции числа хромосомных aberrаций в облученных клетках [7]. Одинаковая зависимость всех исследованных эффектов от ЛПЭ излучений с максимумом при одних и тех же значениях ЛПЭ, а также близкие значения

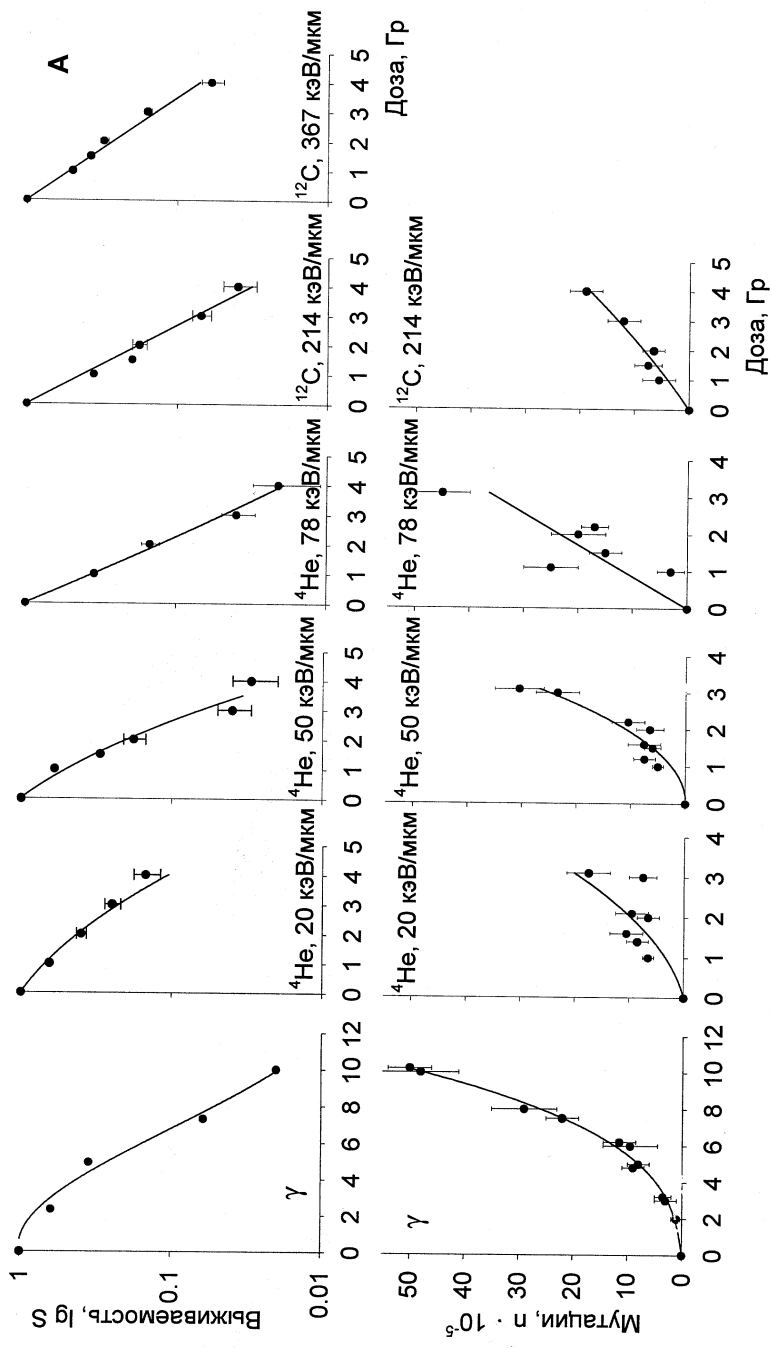


Рис. 7. Зависимость выживаемости (А) и частоты образования мутаций (Б) от дозы облучения клеток китайского хомячка ^{60}Co и ускоренными ионами гелия и углерода с разной ЛПЭ

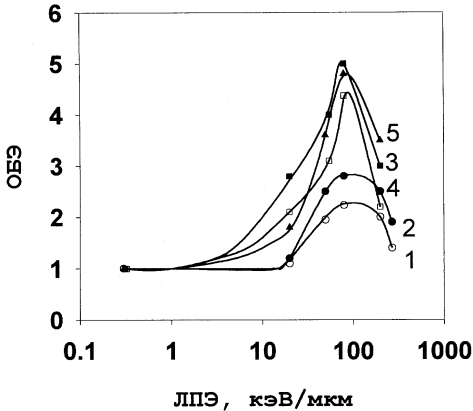


Рис. 8. Зависимость ОБЭ тяжелых ионов от ЛПЭ по выживаемости (1 – по D_0 ; 2 – по 10 %-ному уровню выживаемости); по индукции мутаций (3 – по частоте мутаций $5 \cdot 10^{-5}$, 4 – по частоте мутаций $10 \cdot 10^{-5}$); по индукции хромосомных aberrаций (5)

турной целостности хромосомного аппарата клеток, что может проявиться в хромосомной нестабильности мутантных субклонов. Был проведен цитогенетический анализ [18-20] спонтанных мутантов и радиационно-индуцированных γ -лучами, релятивистскими протонами с энергией 1 ГэВ (ЛПЭ $\sim 0,218$ кэВ/мкм) и ионами азота с энергией 50 МэВ/нуклон (ЛПЭ ~ 77 кэВ/мкм). Выявлена гетерогенность мутантов по исследованным цитогенетическим показателям: митотической активности, анеуплоидии, частоте хромосомных aberrаций. По уровню хромосомных aberrаций нами было условно выделено несколько групп мутантных субклонов (рис. 9): группа I - не отличающиеся от интактного контроля, группа II - с повышенным в 1,5–2 раза их уровнем (доля этих мутантов увеличивалась с ростом дозы), а среди спонтанных и группа III - с экстремально высоким уровнем aberrаций хромосом (более 30% aberrантных клеток). Были обнаружены также полиплоидные (тетраплоидные) мутантные субклоны. При этом среди радиационно-индуцированных мутантов группы I были выявлены мутанты с частотой хромосомных aberrаций в 2–4 раза ниже, чем в интактном контроле (подгруппа Ia). Их доля существенно увеличивалась при облучении плотноионизирующими ионами азота.

Как видно на рис.10, доля мутантов с повышенным уровнем хромосомных aberrаций среди общего числа выделенных мутантов была наибольшей при спонтанном мутагенезе (72%) и снижалась с ростом ЛПЭ индуцирующих излучений, составив 16% при воздействии ионами азота. В то же время доля генетически устойчивых HPRT-мутантов подгруппы Ia (со сниженным по

коэффициентов ОБЭ по тестам мутаций и хромосомных aberrаций дают основание полагать, что в их основе лежат одни и те же первичные изменения, а именно ДР ДНК, приводящие также к структурным нарушениям хромосом и гибели клеток. Накапливающиеся в литературе данные все более указывают на возникновение с высокой частотой именно структурных мутаций генов в клетках млекопитающих и человека [17].

В связи этим нами было проверено предположение, что мутационный процесс сопровождается нарушением струк-

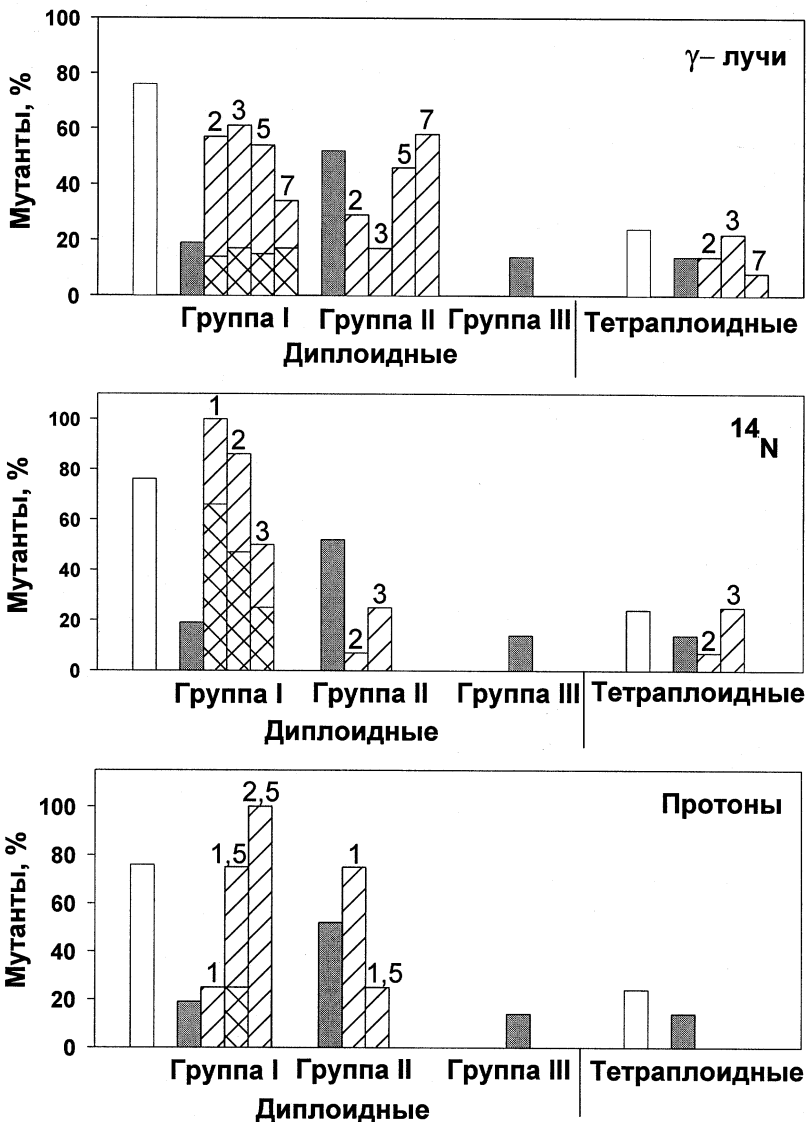


Рис.9. Распределение HPRT- мутантных субклонов по группам (по уровню aberrаций хромосом): спонтанные мутанты (■) и индуцированные (▨) γ - лучами, ионами азота ¹⁴N и протонами, □ контроль, ▩ подгруппа Ia (пояснения в тексте), цифрами обозначены индуцирующие дозы (Гр)

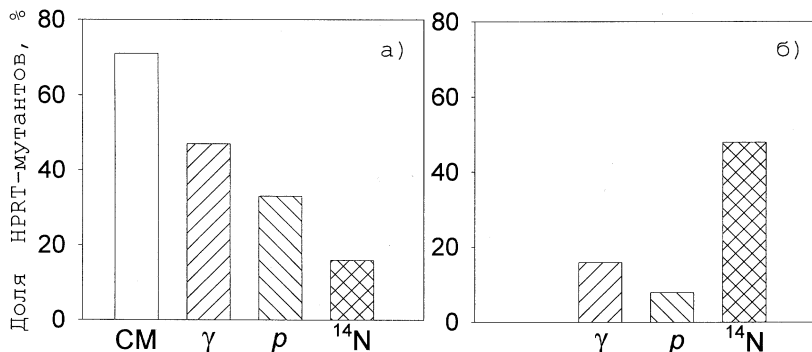


Рис. 10. Частота образования HPRT-мутантов с повышенным (а) и сниженным (б) уровнем хромосомных aberrаций по сравнению с интактным контролем среди спонтанных (СМ) и радиационно-индуцированных γ -лучами (γ), ускоренными протонами (p) и ионами азота (^{14}N)

сравнению с контролем уровнем хромосомных aberrаций) составляла 8–15% при индукции γ -лучами и протонами и увеличивалась почти до 50% от общего числа мутантов при индукции ионами азота. Среди спонтанных мутантов подгруппа Ia не обнаружена. На наш взгляд, появление такой подгруппы мутантов, а также отсутствие среди радиационно-индуцированных мутантов образцов с крайне высоким уровнем aberrаций хромосом (группа III) находит свое объяснение. Можно полагать, что при облучении погибают все клетки с какими-либо дефектами, но жизнеспособные в нормальных условиях, а выживают наиболее полноценные клетки, например с эффективно работающей системой репарации повреждений. Не исключено, что возникшие из таких клеток мутанты могут иметь даже сниженный по сравнению с контролем уровень хромосомных aberrаций. Возможно также, что такие мутантные клетки несут точковые мутации гена, при которых не происходят регистрируемые при их делении структурные нарушения хромосом. По-видимому, наблюдаемая гетерогенность мутантов, варибельность цитогенетических показателей определяется типом возникших мутаций. Их последствия могут проявляться в ряду клеточных поколений как через изменение и нарушение активности гена, так и нарушение активности соответствующего фермента [17]. Они могут быть связаны не только с точковыми мутациями, приводящими к замене аминокислоты в ферменте, но и со структурными изменениями гена (микроделециями, инверсиями, вставками, а также потерей всего гена или его значительной части в случае структурной делеции X-хромосомы, в которой он находится).

В настоящее время структурные хромосомные аномалии, затрагивающие определенные гены, привлекают повышенное внимание исследователей, поскольку становится все более очевидной их роль в патогенезе ряда опухолевых заболеваний у человека, в частности в развитии лейкозиев [21–24]. Как

известно, структурные хромосомные мутации делятся на два типа. Нестабильные aberrации - это грубые деструктивные изменения хромосом (например, дицентрики, несимметричные межхромосомные обмены), которые легко обнаруживаются в клетках так называемым метафазным методом при микроскопировании. Они приводят к нарушению процессов клеточного деления и гибели клеток и элиминируют из облученной клеточной популяции в течение 2–3 циклов деления. Другую группу структурных aberrаций составляют стабильные хромосомные aberrации, как например транслокации (симметричные межхромосомные обмены фрагментами), инсерции (вставка фрагмента одной хромосомы в другую) и некоторые другие. Такие хромосомы ведут себя как нормальные, деление клеток не нарушается, и они способны передаваться из поколения в поколение в течение длительного времени, перенося искаженную генетическую информацию. Это может приводить к тяжелым последствиям. Так, с транслокацией между хромосомами 9 и 22 связано развитие хронической миелоидной лейкемии, а между хромосомами 8 и 14 — лимфомы Беркита. Но до сравнительно недавнего времени не существовало методов для выявления и анализа таких стабильных aberrаций. Это стало возможным только с развитием так называемой FISH-техники (флуоресцентной гибридизации *in situ*) [25,26]. Она позволяет в ходе гибридизации со специфичными для определенных хромосом пробами ДНК, ассоциированными с флуоресцентным красителем, пометить их и с помощью люминесцентного микроскопа обнаружить эти хромосомы и их аномалии.

Закономерности формирования транслокаций хромосом при воздействии ионизирующих излучений, особенно с возрастающими ЛПЭ, еще слабо изучены. В коллаборации со специалистами из Института биофизики ЧАН (Брно, Чехия) нами проведен FISH-анализ лимфоцитов крови человека при воздействии γ -лучей, релятивистских протонов и плотниоизирующих ионов азота ^{14}N с ЛПЭ ~ 77 кЭВ/мкм [27-29]. На рис.11 приведены частота

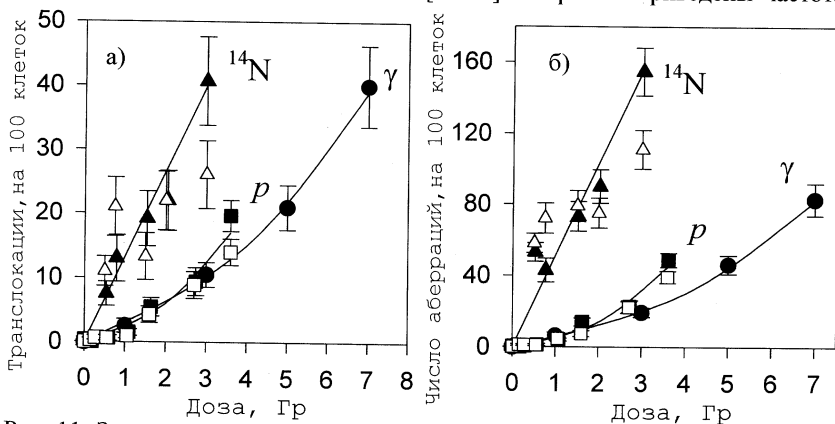


Рис. 11. Зависимость частоты образования транслокаций (а) и общего числа aberrаций (б) хромосомы-1 (темные значки) и хромосомы-2 (светлые значки) от дозы облучения лимфоцитов крови человека протонами (p), ионами ^{14}N и γ -лучами (γ). FISH-метод

транслокаций и общее число aberrаций хромосом 1 и 2 как функция дозы при действии γ -излучения и ускоренных протонов и ионов азота. Их частоты описываются линейно-квадратичной зависимостью при облучении протонами и γ -лучами и линейной при воздействии ионов азота. Видно, насколько более эффективно индуцируются такие хромосомные aberrации при воздействии плотной ионизирующими излучениями. Коэффициент ОБЭ оказывается равным $\geq 3,0$. Четкие дозовые зависимости выхода транслокаций, возможность обнаружения их при низких уровнях доз и в отдаленные периоды после лучевого воздействия привлекают внимание исследователей с точки зрения возможности использования этого теста для целей ретроспективной биологической дозиметрии. И такие работы ведутся.

Анализ хромосом и их нарушений проводится в клетках в период прохождения ими митоза. До сих пор остается невыясненной архитектура ядер клеток, находящихся в интерфазе. FISH-метод оказывается полезным и в таких исследованиях. С его помощью около года назад были получены изображения компьютерной 3D-реконструкции хромосом 1 и 22 лимфоцитов крови человека в контрольной культуре и после облучения релятивистскими протонами с энергией 1 ГэВ на синхрофазотроне ОИЯИ в дозе 0,31 Гр. Эта работа выполняется в коллаборации со специалистами Института физики в Гейдельберге (Германия). В интактных необлученных лимфоцитах через 24 часа культивирования без добавления стимулятора клеточного деления фитогемагглютинина (ФГА) хромосомы 1 в G_0 -фазе клеточного цикла представлены в виде парных компактно упакованных четко отграниченных структур. После 24-часового культивирования с ФГА облученных лимфоцитов (G_1 -фаза) в клетке наблюдался крупный фрагмент (структурная хромосомная мутация) одной из хромосом 1 и изменение конфигурации другой хромосомы 1. При этом компактная структура хромосом сохранялась, однако в месте разрыва участок хромосомы оказался деконденсированным. Полученные данные свидетельствуют в пользу выдвинутой в последние годы гипотезы о доменной архитектуре клеточных ядер, в которых каждая хромосома занимает компактно свою отграниченную территорию [30,31].

В последние годы пристальное внимание радиобиологов привлечено к проблеме биологического действия малых доз ионизирующих излучений. В настоящее время накапливается все больше данных, в том числе по индукции цитогенетических повреждений, свидетельствующих о неправомерности линейной экстраполяции эффектов высоких доз на низкие [32,33]. С помощью полученных нами данных [34-36] при γ -облучении клеток китайского хомячка линии V79 и клеток меланомы человека линии BRO в дозах 1 – 200 сГр выявлена гиперчувствительность хромосом при увеличении доз до 10-20 сГр (рис.12). Число клеток с хромосомными aberrациями увеличивается до значений, характерных для более высоких доз, а затем резко снижается (для клеток меланомы даже ниже контрольного уровня), проявляя обратную дозовую зависимость. Исследования показали, что в диапазоне доз до 50 сГр зависимость эффектов от дозы для обеих линий клеток не является линейной. При дальнейшем увеличении дозы до 200 сГр частота клеток с хромосомными aberrациями линейно повышается с ростом дозы, однако наклон

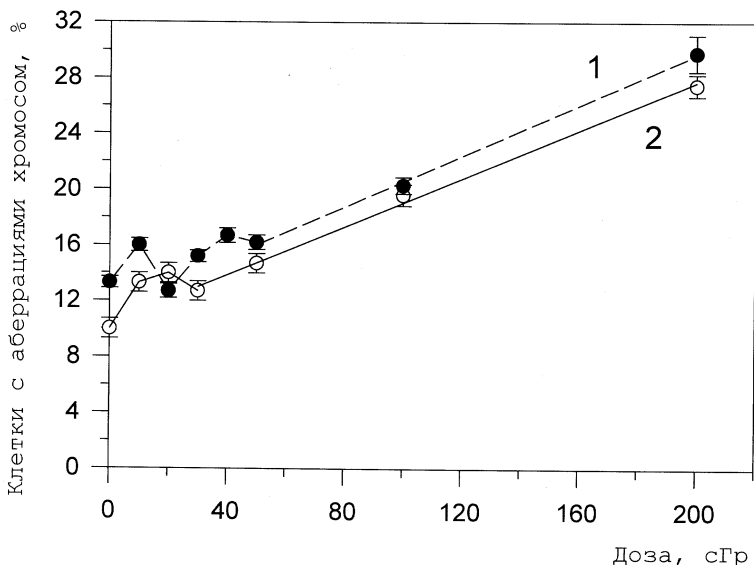


Рис. 12. Зависимость частоты образования клеток с хромосомными aberrациями от дозы γ -облучения: 1 – клетки меланомы человека, 2 – клетки китайского хомячка

кривой в 2-3 раза меньше, чем на первоначальном участке. По-видимому, нарушение линейности и уменьшение наклона кривой является следствием индуцированной радиорезистентности клеток вследствие индукции репарации при определенном уровне повреждений хромосом. Некоторые различия кривых доза – эффект для двух линий клеток дают основания полагать, что системы репарации клеток меланомы запускаются при меньших дозах и работают более эффективно, чем у клеток китайского хомячка.

Выше кратко изложены основные направления радиационно-генетических исследований, проводимых в ОИЯИ. Другое направление работ, начатых несколько лет назад, связано с разработкой новых методов так называемой «мишенной терапии» рака. Под этим понимается селективное разрушение только раковых клеток какими-либо повреждающими агентами, обладающими высоким аффинитетом (тропностью) к раковым клеткам и не затрагивающими нормальные клетки. Ими могут быть радиоизотопы некоторых элементов или соединения, обладающие таким аффинитетом и используемые как носители для соответствующих изотопов. К сожалению, различные химико-терапевтические агенты, которые применяются в настоящее время для лечения раковых заболеваний, не обладают какими-то селективными качествами, ими повреждаются как раковые, так и нормальные клетки, что сопровождается огромными осложнениями и отсутствием достаточно выраженного терапевтического эффекта.

В течение ряда лет в ОИЯИ радиобиологами совместно с радиохимиками проводятся исследования по поиску такого рода соединений. Удалось обнаружить крайне перспективный подход для воздействия на один из типов раковых заболеваний человека, так называемую пигментную меланому. В настоящее время сколько-нибудь эффективных способов излечения от меланомы нет. Для этих исследований нами использована культура клеток пигментной меланомы (линия BRO). Было обнаружено, что высоким аффинитетом к этим клеткам обладает метиленовый синий [3,7-(диметиламино)феназотианинум хлорид]. Оказалось, что по своим химическим свойствам он близок к меланину, пигменту клеток меланомы, придающему ей черную окраску. Пигментосодержащие клетки меланомы активнейшим образом насыщаются это вещество, а нормальные клетки его почти не поглощают. Возникла идея, используя это свойство, создать комплексное соединение с таким изотопом, при распаде которого внутри клетки повреждались бы исключительно опухолевые клетки меланомы. Такая работа была выполнена [37,38]. В качестве повреждающего агента был использован астатин ^{211}At и создано комплексное соединение метиленового синего с ^{211}At ($^{211}\text{At}+\text{MC}$). Этот элемент в природе не существует, у нас его получают искусственным путем на ускорителе многозарядных ионов. С точки зрения радиотерапии он обладает очень интересными свойствами. Этот изотоп является чистым α -эмиттером. Период полураспада составляет 7,2 часа (рис. 13). При распаде его ядра образуется четыре

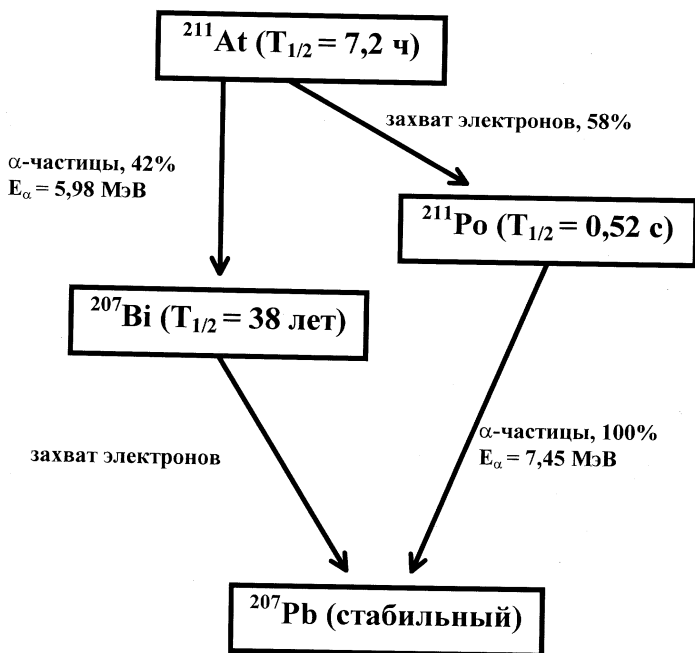


Рис. 13. Схема распада астатина ^{211}At

α -частицы со средней энергией 6,72 МэВ и ЛПЭ ~ 99 кэВ/мкм, а это область максимума ОБЭ для клеток млекопитающих и человека. α -частицы имеют малые пробеги и захватывают только одну-две клетки и, таким образом, разрушение клеток опухоли происходит как бы изнутри. Важно также то, что само ядро ^{211}At после распада и вся цепочка дочерних продуктов практически нерадиоактивны. Комплекс $^{211}\text{At} + \text{МС}$ оказался весьма устойчивым соединением, т. е. он не разрушается при введении в живые организмы.

В лаборатории была исследована выживаемость клеток пигментной меланомы (линия BRO) при введении в культуральную среду разных концентраций ^{211}At в ионной форме и в виде комплекса $^{211}\text{At} + \text{МС}$ (рис.14). Для

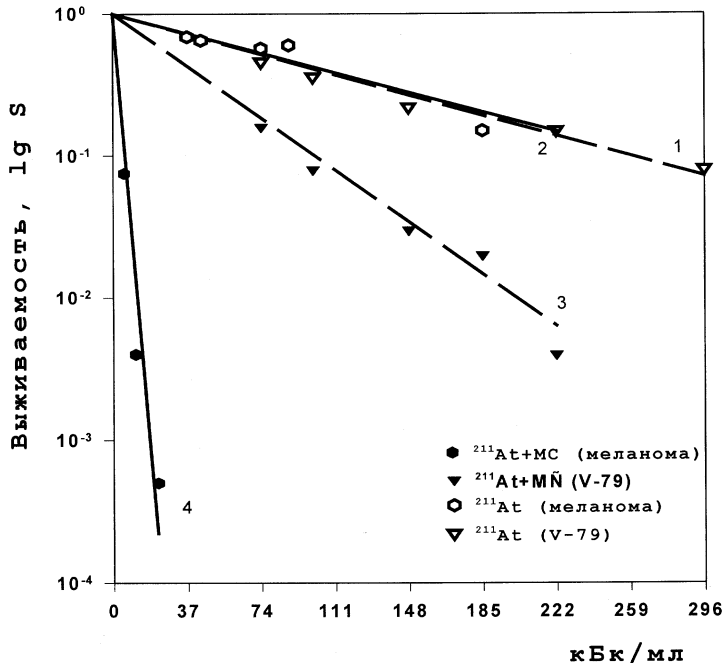


Рис. 14. Выживаемость клеток китайского хомячка (1, 3) и меланомы человека (2, 4) после облучения ^{211}At в ионной форме (1, 2) или в комплексе с метиленовым синим (3, 4)

контроля его действия на нормальные клетки использовали культуру клеток китайского хомячка (линия V-79). Было показано [38], что клетки обеих линий слабо и однозначно реагируют на введение ^{211}At в ионной форме: облучение клеток происходит изотропно, транспорта ^{211}At внутрь клеток не происходит. Но когда комплекс $^{211}\text{At} + \text{МС}$ активно транспортируется внутрь клеток меланомы, то происходит массовая их гибель: наклон кривой резко

увеличивается, т. е. эффективность возрастает почти в 12 раз. Это вселяет надежду на то, что найден способ для терапии самой агрессивной формы раковых заболеваний и преодоления процесса метастазирования и возможен прорыв в этом направлении. Сейчас имеются условия (главное, финансовые, подключаются специалисты соответствующих институтов и фармкомитета) для проведения опытов на животных: это специальная линия бестимусных мышей, у которых снижена активность иммунной системы, что позволяет привить им меланому человека с последующим развитием опухолевого процесса. И затем на этой модели уже *in vivo* исследовать, как будет себя вести комплекс $^{211}\text{At}+\text{МС}$ в плане лучевой терапии. Если все пройдет успешно, то следующий этап — уже клиника.

Вот кратко круг задач, которыми занимается Отделение радиационных и радиобиологических исследований. В качестве информации сообщаем также, что в ОИЯИ создан и введен в практическую эксплуатацию комплекс медицинских пучков протонов с энергиями 100–200 МэВ для лучевой терапии раковых заболеваний. Он работает на базе самого первого ускорителя протонов в Лаборатории ядерных проблем [39]. В этом году в Дубне, в больнице, начало работать постоянное радиологическое отделение для протонной радиотерапии онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Корогодин В.И., Красавин Е.А.* // Радиобиология. 1982. Т. 22. Вып.6. С. 727-738.
2. *Красавин Е.А.* Проблема ОБЭ и репарация ДНК. 1989. // М.: Энергоатомиздат. 193 с.
3. *Корогодин В.И.* Проблемы пострадиационного восстановления. 1966. // М.: Атомиздат. 390 с.
4. *Газиев А.И., Жестянкиков В.Д., Коноплянников А.Г. и др.* Открытие и изучение явления восстановления клеток и их генетических структур от повреждений, вызываемых ионизирующими излучениями. 1987. // Пушчино. 39 с.
5. *Говорун Р.Д., Насонова Е.А., Красавин Е.А. и др.* // Радиобиология. 1987. Т. 27. Вып. 2. С. 177-184.
6. *Козубек С., Красавин Е.А., Говорун Р.Д., Насонова Е.А.* // Радиобиология. 1987. Т. 27. Вып. 2. С. 212-217.
7. *Насонова Е.А., Говорун Р.Д., Красавин Е.А.* // Тр. Рабоч. совещ. по генетическому действию корпускулярных излучений. Дубна. 4-6 октября 1988. ОИЯИ Д19-89-143. Дубна. 1989. С. 169-182.
8. *Красавин Е.А., Козубек С.* Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. 1991 // М.: Энергоатомиздат. 183с.
9. *Амиртаев К.Г., Токарова Б., Красавин Е.А., Козубек С.* // Радиобиология. 1989. Т. 25. Вып. 1. С. 23-29.
10. *Козубек С., Красавин Е.А., Линь И. и др.* // Радиобиология. 1989. Т. 29. Вып. 3. С. 300-304.

11. *Ptitsyn L.R., Horneck G., Kotova O. et al.* // Applied and Environmental Microbiology. 1997. V. 63. № 11. P. 4377-4384.
12. *Любимова К.А., Аникин С.А., Колтовая Н.А., Красавин Е.А.* // Генетика. 1998. Т. 34. № 9. С. 1228-1232.
13. *Колтовая Н.А., Карташова Н.Н., Кадышевская Е.Ю. и др.* // Докл. РАН. 1998. Т. 360. № 3. С. 420-422.
14. *Koltovaya N.A., Kadishevskaya E.Yu., Shvaneva N.V., Devin A.B.* // Current genetics. 1999. V. 35. № 3-4. P. 336.
15. *Thacker J, Stretch A., Stephens M.* // Mutation Res. 1977. V. 42. P. 316-326.
16. *Шмакова Н.Л., Красавин Е.А., Говорун Р.Д. и др.* // Радиационная биология. Радиозэкология. 1997. Т. 37. Вып. 2. С. 213-219.
17. *Говорун Р.Д.* // Радиационная биология. Радиозэкология. 1997. Т.37. Вып. 4. С. 539-548.
18. *Говорун Р.Д., Кошлань И.В., Красавин Е.А., Шмакова Н.Л.* // Радиобиология. Радиационная экология. 1996. Т. 36. Вып. 6. С. 852-859.
19. *Govorun R.D., Krasavin E.A., Shmakova N.L., Koshlan' I.V.* // Тр. Межд. симпоз. "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". 22-25 января 1997. Дубна. 1997. Т. 2. С. 34-42.
20. *Кошлань И.В., Кошлань Н.А., Говорун Р.Д.* // Тр. Второй открытой научной конференции УНЦ ОИЯИ. 2-6 марта 1998. Дубна. 1998. Дубна. ОИЯИ. УНЦ. ОМУС. с. 154-156.
21. *Pui C.H., Crist W.M., Look A.T.* // Blood. 1990. V. 76. № 8. P. 1449-1463.
22. *Heisterkamp N., Groffen J.* // Hematol. Pathol. 1991. V. 5. № 1. P. 1-10.
23. *Rabbits T.H.* // Nature. 1994. V. 372. P. 143-149.
24. *Melo J.V.* // Leukaemia. 1996. V. 10. № 5. P. 751-756.
25. *Pinkel D., Straum T., Gruy J.W.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2934-2938.
26. *Cremer T., Licher P., Borden J. et al.* // Hum. Genet. 1988. V. 80. P. 235-246.
27. *Репин М.В., Говорун Р.Д., Лукашова Е. и др.* // Радиационная биология. Радиозэкология. 1996. Т.36. Вып. 6 С. 848-851.
28. *Репин М.В., Говорун Р.Д., Красавин Е.А. и др.* // Тр. Межд. симпоз. "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". 22-25 января 1997. Дубна. 1997. Т. 2. С. 49-56.
29. *Lukášová E., Kozubek S., Govorun R.D. et al.* In: Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation. Eds.by C.Baumstark-Khan, S.Kozubek and G.Horneck. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London. // NATO Science Series 2: Environmental Security. 1999. V. 55. P. 195-202.
30. *Lichter P., Cremer T., Borden J. et al.* // Hum. Genet. 1988. V. 80. P. 224-234.
31. *Cremer T., Lichter P., Borden J. et al.* // Hum. Genet. 1988. V. 80. P. 235-246.
32. *Pohl-Rüling J., Fischer P., Haas O. et al.* // Mutation Res. 1989. V. 110. P. 71-82.
33. *Joiner M.C., Lambin P., Malaise E.P. et al.* // Mutation. Res. 1996. V. 358. P. 171-183.
34. *Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А.* // Радиационная биология. Радиозэкология. 1998. Т.38. Вып. 6. С. 841-847.

35. *Shmakova N.L., Fadeeva T.A., Krasavin E.A. et al.* // *Nukleonika*. 1999. V. 44. № 4. P. 539-548.
36. *Шмакова Н.Л., Абу Зеид О., Фадеева Т.А. и др.* // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 1999. Т. 40. Вып. 40. С. 404-409.
37. *Norseev Ju.V., Shmakova N.L.* // *Nukleonika*. 1995. V. 40. № 1. P. 13-25.
38. *Shmakova N.L., Krasavin E.A., Norseev Ju.V. et al.* // *Nuclear Medicine Communications*. 1999. V. 20. № 5. P. 466.
39. *Джелепов В.П., Савченко О.В., Астрахан Б.В., Рудерман А.И.* // *ОИЯИ*. P16-11183. Дубна. 1978. 11с.

Рукопись поступила в издательский отдел
19 октября 2000 года.

Обобщены результаты многолетних радиобиологических и радиационно-генетических исследований в ОРРИ (отдел радиобиологии). Рассмотрены различные радиационные эффекты, индуцированные в клетках бактерий, дрожжей, млекопитающих и человека после облучения γ -лучами и тяжелыми заряженными частицами. Показана важная роль процессов репарации ДНК в биологической эффективности разных типов ионизирующих излучений. Проанализированы данные по мутагенному действию γ -лучей и тяжелых заряженных частиц на про- и эукариотические клетки. На основании наших данных выявлена гиперчувствительность хромосом человека и млекопитающих при γ -облучении малыми дозами (10–20 сГр). Исследовано радиобиологическое действие комплекса ^{211}At — метиленовый синий на клетки меланомы человека. Показана экстремально высокая эффективность этого комплекса на клетки меланомы.

Работа выполнена в Отделении радиационных и радиобиологических исследований ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2000

Перевод авторов

The results of long-term radiobiological and radiation-genetical research in DRRR (Division of Radiobiology) are summarized. The different radiation-induced effects in bacteria, yeasts, mammalian and human cells after irradiation by γ -rays and heavy charged particles are considered. The important role of DNA repair processes in biological effectiveness of different types of radiation were shown. The data on mutagenic action of such kinds of radiation on pro- and eukaryotic cells were analyzed. On the basis of our data the hypersensitivity of human and mammalian chromosomes after low doses of γ -rays (10–20 sGy) was revealed. The radiobiological effect of ^{211}At — methylene blue complex on human melanoma cells was studied. The extremely high effectiveness of this complex on melanoma cells was shown.

The investigation has been performed at the Division of Radiation and Radiobiological Research, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2000

Редактор Е.Ю.Шаталова. Макет Н.А.Киселевой

Подписано в печать 08.11.2000

Формат 60 × 90/16. Офсетная печать. Уч.-изд. листов 2,07

Тираж 230. Заказ 52336. Цена 2 р. 49 к.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
Дубна Московской области