Молекулярная и клеточная радиационная биология

Допущено
Министерством образования
Республики Беларусь
в качестве учебного пособия
для студентов
учреждений высшего образования
по специальности
«Медицинская экология»

Минск
«Вышэйшая школа»
2021

УДК
ББК
М

Авторы: А.Н. Батян, И.Э. Бученков, Н.Г. Власова, Н.В. Герасимович, В.А. Кравченко, С.Б. Мельнов, И.В. Пухтеева

Рецензенты: кафедра радиационной медицины и экологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (заведующий кафедрой кандидат медицинских наук, доцент *А.Р. Аветисов*), декан биологического факультета учреждения образования «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины» доктор биологических наук, профессор *В.С. Аверин*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или любой ее части не может быть осуществлено без разрешения издательства.

ISBN 978-985-06-3312-5

© Оформление. УП «Издательство “Вышэйшая школа”», 2021

ПРЕДИСЛОВИЕ

Создание данного пособия обусловлено недостатком учебно-методической литературы о влиянии ионизирующего излучения на молекулярный и клеточный уровни организации живой материи.

Материал данного пособия впервые содержит систематизированные современные научные знания по молекулярным и клеточным аспектам воздействия ионизирующего излучения на биологические системы. Глубоко рассмотрены вопросы взаимодействия ионизирующего излучения с веществом, а также детально освещены вопросы теоретических основ в развитии радиобиологического ответа организма. Особое внимание уделено проблемам выживаемости клеток при облучении и формам клеточной гибели.

Впервые в современной интерпретации представлен раздел, посвященный немишенным эффектам действия ионизирующего излучения, и подробно описаны механизмы радиационно-индуцированного канцерогенеза.

Учебное пособие предназначено студентам, магистрантам, аспирантам и преподавателям экологических, биологических, биомедицинских специальностей высших учебных заведений. Может быть использовано при преподавании таких спецкурсов и предметов, как «Радиационная медицина», «Радиационная генетика», «Радиационная биохимия», «Патологическая физиология», «Безопасность жизнедеятельности».

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

А – активность
АФК – активные формы кислорода
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
АЭС – атомная электростанция
Бк – беккерель
ГК – глюкокортикоиды
Гр – грэй
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
Дж – джоуль
Зв – зиверт
ИИ – ионизирующее излучение
ИЛ – интерлейкин
ИР – ионизирующая радиация
К – керма
Ки – кюри
кэВ – килоэлектронвольт
кДа – килодальтон
ЛД – летальная доза
ЛПИ – линейная плотность ионизации
ЛПЭ – линейная передача энергии
МэВ – мегаэлектронвольт
МЦ – митотический цикл
МКРЕ – Международная комиисия по радиационным единицам
МКРЗ – Международная комиссия по радиациологической защите
НКДАР – Научный комитет (ООН) по действию атомной радиации
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид
ОБЭ – относительная биологическая эффективность
ООН – Организия Объединенных Наций
ПРТ – первичные радиотоксины
Р – рентген
рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
Тр53 (р53) – белок-«страж генома»
СПИД – синдром приобретенного иммунного дефицита
ФНО – фактор некроза опухолей
ЧАЭС – Чернобыльская атомная электростанция
эВ – электронвольт

Глава 1

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ВЕЩЕСТВОМ

1.1. Общая характеристика механизмов взаимодействия ионизирующих излучений с веществом

Процессы, возникающие при прохождении ионизирующего излучения (ИИ) через вещество, имеют исключительно важное практическое значение как для самой ядерной физики, так и для соприкасающихся с ней областей науки и техники. Без хорошего знания этих процессов нельзя понять методы регистрации ядерных частиц или, например, рассчитать толщину биологической радиационной защиты от ядерных излучений для ускорителя частиц или ядерной энергетической установки.

Общая картина прохождения частиц высокой энергии через вещество крайне сложна. Частицы взаимодействуют с электронами, находящимися на различных оболочках, рассеиваются полями ядер, а при достаточно больших энергиях вызывают и различные ядерные реакции. Кроме того, при достаточно высоких энергиях частиц неизбежно возникают вторичные эффекты.

Например, пучок высокоэнергетических электронов порождает в веществе мощный поток вторичных γ-квантов, который необходимо учитывать при расчете радиационной защиты. Это вовсе не значит, что процессы прохождения через вещество совершенно не поддаются расчету. Целый ряд важнейших величин, характеризующих эти процессы, удается довольно точно рассчитать или хотя бы оценить.

По механизму ионизации вещества ИИ можно разбить на две группы:

- непосредственно ионизирующие излучения;
- косвенно ионизирующие излучения.

В свою очередь непосредственно ионизирующие излучения можно подразделить следующим образом:

- тяжелые заряженные частицы с массой, большей либо равной массе протона (протон, α-частица, дейтрон, осколки деления ядер и т.п.);
- легкие заряженные частицы (электроны и позитроны) с массой, меньшей 200 масс электрона (e^-, e^+, μ^+).

К косвенно ионизирующим излучениям относятся:

- γ-излучение;
- рентгеновское излучение;
- нейтронное излучение.

Контрольные вопросы

1. Почему процессы, возникающие при прохождении ИИ через вещество, имеют исключительно важное практическое значение?
2. Частицы с каким интервалом энергий представляют наибольший практический интерес? Почему?
3. Что представляет собой общая картина прохождения частиц высокой энергии через вещество?
4. Благодаря каким причинам процессы взаимодействия ИИ с веществом удается довольно точно рассчитать или хотя бы оценить?
5. На какие группы можно разбить ИИ по механизму ионизации вещества?
6. Каким образом подразделяются непосредственно ионизирующие и косвенно ионизирующие излучения?

1.2. Взаимодействие электромагнитных ионизирующих излучений с веществом

1.2.1. Ядерные взаимодействия γ-квантов

Способы ядерного взаимодействия γ-квантов встречаются достаточно редко (использование радиоактивных изотопов как индикаторов).

Ядерные реакции. Гамма-кванты очень высокой энергии (выше 6 мегаэлектронвольт (МэВ)) могут взаимодействовать с ядром, вызывая возбуждение нуклонов. Это может привести к выбросу частицы, обычно нейтрона, и к превращению атома в другой нуклид (реакция γ, n).

Ядерное резонансное рассеяние. В некоторых ситуациях γ-квант может поглотиться ядром без последующей эмиссии частицы. Ядро остается в этом возбужденном состоянии короткий, но неизмеримый период времени. Последующее испускание γ-кванта восстанавливает стабильность ядра. Атом, подвергнувшийся воздействию γ-кванта, остается тем же самым, без каких-либо превращений.

Брэгговское рассеяние (***дифракция***). Гамма-кванты низкой энергии могут быть рассеяны кристаллической решеткой без потери энергии. Дифракция рентгеновского излучения может быть эффективно использована для изучения молекулярной структуры; это явление не имеет значения для метода меченных атомов.

Контрольные вопросы

1. Какие эффекты вызывают γ-кванты очень высоких энергий?
2. В каких случаях наблюдается ядерное резонансное рассеяние?
3. Для каких целей может использоваться Брэгговское рассеяние?

1.2.2. Фотоэлектрический эффект

При *фотоэлектрическом эффекте* (рис. 1.1) энергия падающего кванта полностью поглощается веществом, в результате появляются свободные электроны, обладающие определенной кинетической энергией, величина которой равна энергии кванта излучения за вычетом работы выхода данного электрона из атома. Свободный электрон, ассоциируясь с одним из нейтральных атомов, порождает отрицательный ион.

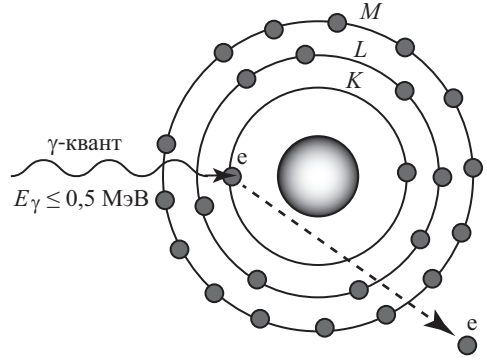

Рис. 1.1. Фотоэлектрический эффект

Вероятность фотоэффекта зависит от энергии падающего кванта и атомного номера поглощающей среды. Фотоэффект характерен для длинноволнового рентгеновского излучения и γ-излучения невысоких энергий. Его вероятность зависит от атомного номера и пропорциональна Z^3.

Вероятность отрыва электрона от атома максимальна, если фотон имеет достаточную энергию, чтобы сорвать электрон с его оболочки. Фотоэлектрическое поглощение происходит на связанных электронах в основном *K*-оболочки.

С повышением энергии излучения вероятность фотоэффекта уменьшается, и для излучений с энергией, значительно превышающей внутриатомные энергии связи (> 1 МэВ), его вкладом во взаимодействие можно пренебречь. Главную роль при этом начинает играть другой способ размена энергии – *эффект Комптона*.

Контрольные вопросы

1. Чему равна энергия образующихся электронов при фотоэффекте?
2. От чего зависит вероятность фотоэффекта?
3. Какую схему, иллюстрирующую фотоэффект, можно начертить? Как ее объяснить?

1.2.3. Эффект Комптона

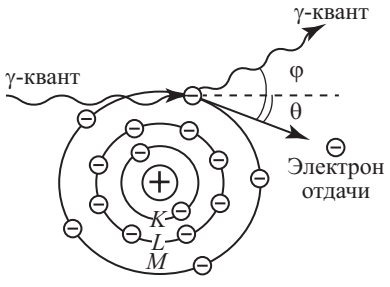

Рис. 1.2. Эффект Комптона

Комптоновский процесс есть взаимодействия между фотоном γ-кванта либо коротковолнового рентгеновского излучения и свободным или слабо связанным орбитальным электроном атома поглощающего вещества. Как видно из рис. 1.2, падающий γ-квант выбивает орбитальный электрон атома вещества. Часть его энергии поглощается, а часть передается в виде кинетической энергии электрону отдачи. Образующийся вторичный γ-квант имеет меньшую энергию и другое направление. В дальнейшем вторичный он может вновь претерпевать еще несколько столкновений, пока не потеряет всю свою энергию.

В воде и биологических тканях поглощение излучения с энергией квантов от 100 килоэлектронвольт (кэВ) до 10 МэВ в основном происходит за счет эффекта Комптона.

Если энергия падающего кванта превышает 1,02 МэВ, становится возможным третий тип взаимодействия – эффект образования пар.

Контрольные вопросы

1. При какой величине энергии падающего кванта наблюдается эффект Комптона?
2. Какие процессы происходят при эффекте Комптона?
3. Какую схему, иллюстрирующую эффект Комптона, можно начертить? Как ее объяснить?

1.2.4. Образование электрон-позитронных пар

Этот вид взаимодействия излучения с веществом характеризуется возможностью превращения γ-кванта большой энергии (> 1,02 МэВ – эта энергия эквивалентна суммарной массе покоя одного электрона (0,51 МэВ) и одного позитрона (0,51 МэВ)) в пару заряженных частиц – электрон и позитрон, – которые выбрасываются с места их возникновения с различной энергией. Этот процесс вызывается взаимодействием γ-кванта с каким-либо атомным ядром, в поле которого и образуется электронно-позитронная пара. Вероятность такого процесса пропорциональна Z^2, и поэтому для тяжелых элементов она больше, чем для легких. Возникшие при этом электрон и позитрон растрачивают свою энергию в основном на ионизацию. После остановки позитрон аннигилирует, выбрасывая в противоположных направлениях два γ-кванта с энергией 0,51 МэВ (рис. 1.3).

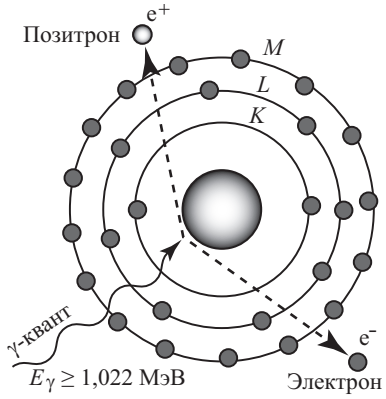

Рис. 1.3. Образование электронно-позитронных пар

Области практической значимости различных взаимодействий, а именно фотоэффекта, комптон-эффекта и рождения пар, зависят от энергии фотонов для каждой среды. Можно выделить три диапазона энергии, в которых преобладает каждый из видов взаимодействий (рис. 1.4).

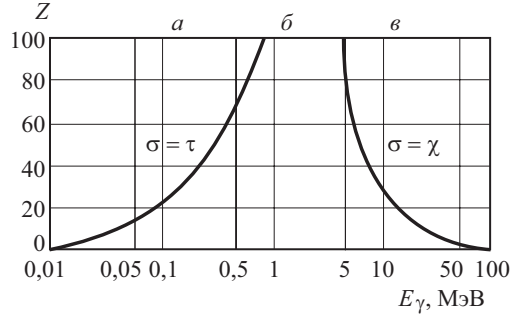

Рис. 1.4. Области различных взаимодействий:
а – область преобладания фотоэлектрического эффекта; *б* – область преобладания комптоновского эффекта; *в* – область преобладания эффекта образования пар

В свинце, например, фотоэффект более част, чем комптон-эффект при энергиях ниже 500 кэВ и чем рождение пар при энергиях выше 5 МэВ.

В легких средах, таких как углерод, кислород, азот, для диапазона энергий от 50 кэВ до 20 МэВ практически единственным является комптон-эффект.

Контрольные вопросы

1. При какой энергии падающего кванта возможно образование электрон-позитронных пар? Какова вероятность этого процесса?
2. Какую схему образования электронно-позитронных пар можно начертить?
3. Используя данные, приведенные на рис. 1.4, как можно охарактеризовать относительную роль трех типов взаимодействия γ-излучения с веществом?
4. Какой эффект наиболее вероятен при облучении биологических объектов? Почему?

1.2.5. Закономерности поглощения γ-излучения

Линейный коэффициент поглощения ($\mu_л$). Поглощения γ-излучения происходит по экспоненциальному закону (чем толще поглотитель, тем больше будет поглощение), поэтому этот вид излучения не имеет строго определенного пробега. Рассчитывается обычно на сантиметр (1/см).

Линейный коэффициент поглощения зависит от энергии γ-квантов и материала поглотителя (табл. 1.1).

Таблица 1.1. **Линейные коэффициенты поглощения в некоторых поглотителях**

Энергия падающего пучка, МэВ	Линейный коэффициент поглощения, $см^{-1}$			
	Вода	Алюминий	Железо	Свинец
1,0	0,071	0,168	0,44	0,79
1,5	0,057	0,136	0,40	0,590
2,0	0,050	0,117	0,33	0,504

Массовый коэффициент поглощения ($\mu_м$). Эта величина равна линейному коэффициенту поглощения, деленному на плотность поглотителя. Преимущество данной величины в том, что она не зависит от природы поглотителя.

Иногда применяют:

- атомный коэффициент поглощения ($\mu_а$) – учитывает действительное число атомов в поглощающем материале и равен доле энергии, поглощаемой на один атом поглотителя;
- электронный коэффициент поглощения ($\mu_э$) – доля излучения, поглощенная на электрон поглотителя. Применяется для γ-квантов низкой энергии, которые взаимодействуют преимущественно с орбитальными электронами.

Толщина слоя полупоглощения. Эта величина определяется как толщина слоя материала поглотителя, который снижает интенсивность падающего излучения вдвое. Толщину слоя полупоглощения используют при вычислении защиты, необходимой для снижения интенсивности γ-излучения до требуемых уровней.

Контрольные вопросы

1. Как обозначается, в каких единицах измеряется и от какого фактора зависит линейный коэффициент поглощения γ-излучения?
2. В чем преимущество использования массового коэффициента поглощения? Как обозначается, расчитывается и в каких единицах измеряется данный коэффициент?
3. В чем преимущество массового коэффициента поглощения по сравнению с линейным коэффициентом?
4. Для каких целей применяется и как обозначается электронный коэффициент поглощения?
5. Как определяется и для чего используется толщина слоя полупоглощения?

1.3. Взаимодействие корпускулярных ионизирующих излучений с веществом

1.3.1. Типы взаимодействия α-частиц с веществом

Механизм передачи энергии в объекте от всех заряженных частиц один и тот же. При прохождении через вещество заряженная частица теряет свою энергию, вызывая ионизацию и возбуждение атомов до тех пор, пока общий запас энергии уменьшится настолько, что частица утратит ионизирующую способность. В зависимости от знака заряда при пролете частицы в веществе она, испытывая электростатическое взаимодействие, притягивается или отталкивается от положительно заряженных ядер. Чем больше масса летящей частицы, тем меньше она отклоняется от первоначального направления. Поэтому траектория протонов и более тяжелых ядерных частиц практически прямолинейна, а траектория электронов сильно изломана вследствие рассеяния на орбитальных электронах и ядрах атомов.

При взаимодействии заряженных частиц с веществом выделяют упругое взаимодействие и неупругое.

При *упругом взаимодействии* суммарная кинетическая энергия частиц до взаимодействия равна суммарной кинетической энергии после их взаимодействия. Следствие этого взаимодействия – лишь изменение направления движения частиц.

Неупругое взаимодействие – это процесс, при котором часть кинетической энергии частиц расходуется на ионизацию и возбуждение атомов, возбуждение ядер, расщепление ядер или тормозное излучение. При этом суммарная кинетическая энергия частиц до взаимодействия будет равна суммарной кинетической энергии частиц после взаимодействия плюс энергия, затраченная на ионизацию и возбуждение атомов, возбуждение и расщепление ядер или тормозное излучение.

Для α-частиц характерны оба типа взаимодействия: упругое рассеяние α-частиц на атомных ядрах; неупругое взаимодействие α-частиц с орбитальными электронами (следствие – возбуждение атомов и ионизация).

Сильное электростатическое поле, окружающее α-частицу, оказывает значительное влияние на орбитальные электроны атомов, лежащих вблизи пути частицы. Во многих случаях расположенные на внешних орбитах электроны могут быть совсем отторгнуты от атома. В других случаях электроны с внутренних орбит могут переместиться на более далекие от ядер орбиты. При таком взаимодействии с орбитальными электронами рассеивается кинетическая энергия α-частицы.

Возбуждение. Это взаимодействие, при котором орбитальные электроны получают энергию от пролетающей α-частицы, но не покидают совсем свои атомы. Вслед за этим электроны вновь перемещаются на свои орбиты и испускают избыточную энергию в виде фотонов видимой или близкой к ней области, т.е. сцинтилляции. Количество передаваемой энергии в этом процессе обычно невелико.

Ионизация. Когда α-частица срывает орбитальный электрон с атома, с которым она взаимодействует, потеря отрицательно заряженного электрона оставляет атом в форме положительно заряженного иона. Вместе электрон и положительный атом составляют пару ионов, процесс этот называется ионизацией. Образование каждой пары ионов требует затраты в среднем около 34 электронвольт (эВ) кинетической энергии α-частицы, т.е. α-частица с энергией 6,8 МэВ образует, пока ее энергия полностью не израсходуется, около $2 \cdot 10^5$ пар ионов. Следовательно, ионизация является наиболее важным процессом передачи энергии α-частицы взаимодействующему с ней веществу. Треки α-частиц практически прямолинейны.

Удельная ионизация – число пар ионов, образуемых на единицу пути (в сантимерах) по следу α-частицы (или другой ионизирующей частицы) в воздухе при нормальном давлении, т.е. интенсивность ионизации. На рис. 1.5 представлена кривая изменения удельной потери энергии α-частицы вдоль ее пробега в воздухе. Эта кривая носит название кривой Брэгга.

Удельная ионизация пучка α-частиц резко возрастает в конце их пробега. Это происходит потому, что в результате многих столкновений α-частицы теряют большую часть своей кинетической энергии и их скорость снижается. Вследствие сниженной скорости они остаются дольше вблизи молекул вдоль своего пути, и, таким образом, значительно возрастает вероятность взаимодействия α-частиц с этими молекулами. После того как величина удельной ионизации достигает максимума, она резко снижается до нуля. В этой точке α-частицы, потерявшие свою кинетическую энергию, захватывают два электрона и становятся нейтральными атомами гелия-4.

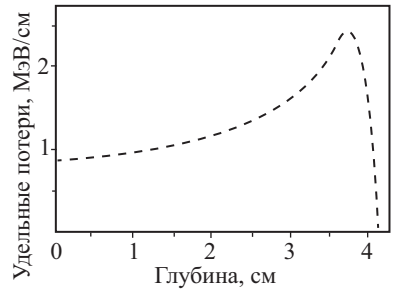

Рис. 1.5. Кривая распределения энергии α-излучений в воздухе (кривая Брэгга)

Поскольку энергия α-излучения, испускаемого данным радиоактивным источником, дискретна, α-частицы пролетают в воздухе строго определенное расстояние.

Пробег α-частиц в среде иной, чем газовая, будет значительно меньше вследствие большей плотности жидкостей и твердых веществ (табл. 1.2). На практике он очень мал и измеряется в микрометрах (мкм).

Таблица 1.2. **Линейный пробег α-частиц с энергией 7 МэВ в некоторых поглотителях, мкм**

Поглотитель	Воздух	Вода (ткань)	Алюминий	Слюда	Медь	Свинец
Линейный пробег	57 000	74	34	29	14	2

Вследствие того что эти меры пробегов очень малы, пользуются понятием *эквивалентная толщина* – толщина (в сантиметрах) поглотителя (которая по поглощению α-излучения эквивалентна 1 см воздуха), умноженная на плотность вещества (в граммах на сантиметр или, если умножить на 1000, в миллиграммах на сантиметр в квадрате). Единица измерения эквивалентной толщины – мг/см^2 (табл. 1.3).

Таблица 1.3. **Эквивалентная толщина некоторых наиболее употребительных поглотителей α-частиц с энергией 7 МэВ, мг/см^2**

Поглотитель	Воздух	Слюда	Алюминий	Медь	Серебро	Золото
Толщина поглотителя	1,2	1,4	1,62	2,26	2,86	3,96

Контрольные вопросы

1. Чем отличается упругое взаимодействие заряженных частиц с веществом и от неупругого?
2. Как можно охарактеризовать типы взаимодействия α-частиц с атомами?
3. Почему ионизация (по сравнению с возбуждением) является более важным процессом передачи энергии α-частицы взаимодействующему с ней веществу?
4. В каких единицах измеряется удельная ионизация α-частицы и как называется кривая распределения ее энергии в веществе?
5. Почему удельная ионизация пучка α-частиц резко возрастает в конце их пробега?
6. От какого фактора зависит пробег α-частиц в среде? Какая величина служит мерой ее пробега и в каких единицах она измеряется?

1.3.2. Взаимодействие β-излучения с веществом

Как и α-частицы, β-частицы рассеивают свою энергию главным образом в процессах ионизации и возбуждения атомов, с которыми они взаимодействуют. Вид взаимодействия легких частиц, при котором практически меняется лишь направление их движения, а не энергия, иногда называют *упругим рассеянием* в отличие от *неупругого рассеяния* (торможения), которое наблюдается при прохождении электрона очень высокой энергии вблизи ядра. При этом существует еще один тип потери энергии – при торможении β-частиц большой энергии в кулоновском поле атомных ядер испускается электромагнитное излучение с длинами волн, соответствующими рентгеновскому. Этот процесс называется *тормозным излучением*. Следовательно, при прохождении через вещество электронов высокой энергии происходит *образование электромагнитного излучения*.

Трек β-частиц очень извилист. Для β-частиц удельная ионизация быстро снижается по мере увеличения их энергии. В конце пробега β-частицы ее энергия снижается до нескольких килоэлектронвольт, вследствие чего потеря энергии на единицу пути и ионизация возрастают.

Пробег для β-частиц выражается в эквивалентной толщине. Наиболее часто в качестве поглотителя используют алюминий.

Контрольные вопросы

1. Каким образом β-частицы рассеивают свою энергию?
2. В чем суть процесса образования тормозного излучения у β-частиц?
3. Каковы особенности пробега β-частиц?

1.3.3. Взаимодействие нейтронов с веществом

В отличие от заряженных частиц нейтроны не несут электрического заряда, что позволяет им беспрепятственно проникать вглубь атомов. Достигая ядер, они либо поглощаются ими, либо рассеиваются на них.

Упругое рассеяние нейтронов. В результате упругого рассеяния нейтрона (n, n) на ядре энергия первичного нейтрона E_n распределяется между рассеянным нейтроном и ядром отдачи. Относительные доли энергии нейтрона δ_E, передаваемые ядрам некоторых элементов при упругом рассеянии, представлены в табл. 1.4.

Таблица 1.4. **Относительные доли энергии нейтрона δ_E, передаваемые ядрам некоторых элементов при упругом рассеянии**

Элемент	Водород	Углерод	Кислород	Свинец
Массовое число А	1	12	16	208
δ_E	0,5	0,142	0,111	0,0096

В результате упругого рассеяния нейтронов образуются *сильноионизирующие протоны*. Атомные ядра при поглощении нейтронов становятся неустойчивыми и, распадаясь, порождают протоны, α-частицы и фотоны γ-излучения, также способные производить ионизацию. При таких ядерных реакциях могут образовываться радиоактивные изотопы элементов и возникнуть наведенная радиоактивность, в свою очередь тоже вызывающая ионизацию. Ионизируют вещество, наконец, и сами ядра отдачи, возникающие при ядерных превращениях.

При упругом рассеянии на ядрах углерода, азота, кислорода и других элементов, входящих в состав тканей, нейтрон теряет лишь 10–15% энергии, а при столкновении с почти равными с ним по массе ядрами водорода – протонами – энергия нейтрона уменьшается в среднем вдвое, передаваясь протону отдачи. Поэтому вещества, содержащие большое количество атомов водорода (воду, парафин), используют для защиты от нейтронного излучения: в них нейтроны быстро растрачивают свою энергию и замедляются. При этом часть энергии нейтрона передается протону отдачи в качестве кинетической. Нейтрон рассеяния отклоняется от прежнего направления и обладает меньшей энергией.

Таким образом, и при нейтронном облучении конечный биологический эффект связан с ионизацией, производимой опосредованно вторичными частицами или фотонами. Следовательно, преимущественный вклад того или иного вида ядерного взаимодействия нейтронов зависит от их энергии, а также от состава облучаемого вещества.

Неупругое взаимодействие нейтронов. Происходит в виде реакции неупругого рассеяния нейтронов (n, n′γ), всевозможных ядерных реакций: (n, γ); (n, p); (n, α); (n, nρ); (n, 2 n), а также реакции вынужденного деления атомных ядер (n, *f*).

Ядерные реакции под действием нейтронов могут проходить как прямые или через составное ядро.

В зависимости от энергетического баланса реакции могут быть экзоэнергетическими (т.е. проходящими при любой энергии нейтронов), например реакция радиационного захвата (n, γ), ${}^{3}_{2}\mathrm{He}$ (n, p)$-{}^{3}_{1}\mathrm{H}$ ($Q \approx$ $\approx$ 0,77 МэВ), ${}^{6}_{3}\mathrm{Li}$ (n, α)$-{}^{3}_{1}\mathrm{H}$ ($Q \approx$ 4,78 МэВ), ${}^{10}_{5}\mathrm{B}$ (n, α)$-{}^{7}_{3}\mathrm{Li}$ ($Q \approx$ 2,78 МэВ), реакции ядерного деления (n, *f*) на изотопах ${}^{235}_{92}\mathrm{U}$ и ${}^{239}_{94}\mathrm{Pu}$, либо пороговыми, например реакции (n, 2 n) при $E_n > 8$ МэВ.

Контрольные вопросы

1. Что позволяет нейтронам беспрепятственно проникать вглубь атомов? Что происходит с нейтронами при достижении ими ядер атомов?
2. Как происходит упругое рассеяние нейтронов?
3. Какие реакции происходят при неупругом рассеянии нейтронов? Какова энергия этих процессов?

1.4. Потенциал ионизации, линейная передача энергии

Одно и то же количество энергии можно сообщить биологическому объекту при облучении различными типами ионизирующих частиц. Поглощенная энергия затрачивается на возбуждение и ионизацию атомов и молекул. В основе конечного радиобиологического эффекта лежат физико-химические превращения возбужденных и ионизированных молекулярных структур.

Биологический эффект ионизирующего излучения не только связан с количеством поглощенной энергии, но и в значительной степени зависит от характера пространственного микрораспределения поглощенной энергии.

Поглощение одной и той же дозы излучения приводит к различным эффектам. Энергию, переданную заряженной частицей на единице длины ее пробега в веществе, называют линейной передачей энергии (ЛПЭ).

Величина потери энергии на единицу пробега (ЛПЭ) обратно пропорциональна кинетической энергии частицы и связана с плотностью распределения событий ионизации вдоль трека частицы.

Это критерий «качества» излучения, эффективности его биологического действия. В математических выражениях ЛПЭ обозначается символом *L* и расчитывается по формуле

$$L = \frac{\text{Энергия, переданная частицей веществу, кэВ}}{\text{Расстояние, пройденное частицей, мкм}}.$$

Понятие ЛПЭ было введено Р. Цирклем в 1954 г. За единицу ЛПЭ принимают 1 кэВ/мкм ткани (1 кэВ/мкм = 62 джоуля на метр (Дж/м)).

В зависимости от значения ЛПЭ все ионизирующие излучения делят на редко- и плотноионизирующие.

Типичные уровни ЛПЭ для наиболее распространенных видов излучений следующие: α-излучение ${}^{60}\mathrm{Co}$ и рентгеновское излучение с длиной волны ≈ 20 нм (250 кэВ) имеют соответственно ЛПЭ около 0,3 кэВ/мкм и 2 кэВ/мкм, нейтроны с энергией 14 МэВ – 12, а тяжелые заряженные ядерные частицы – от 100 кэВ/мкм до 2000 кэВ/мкм.

Однако такое деление достаточно условно, так как ЛПЭ не только связана с физической природой излучения, но зависит, например, от скорости полета частицы.

В современных мощных ускорителях тяжелые частицы разгоняют до столь больших энергий, что их скорость приближается к скорости света. В этом случае ЛПЭ всех частиц снижается до минимального значения, характерного для редкоионизирующих легких частиц (например, электронов) с энергией 1 МэВ. Поэтому при очень большой скорости движения быстрые протоны и электроны имеют одинаковую ЛПЭ, так как обладают равным по величине зарядом.

К редкоионизирующим излучениям принято относить все виды излучений (независимо от их физической природы), имеющие величину ЛПЭ < 10 кэВ/мкм, к плотноионизирующим – те, для которых ЛПЭ превышает эту величину. Нейтроны относят к плотноионизирующим излучениям, так как образуемые ими протоны отдачи сильно ионизируют вещество. Однако их возникновение происходит на большой глубине из-за высокой проникающей способности нейтронов.

Границей между ними условно принята величина ЛПЭ = 10 кэВ/мкм. При снижении скорости заряженных частиц ЛПЭ возрастает.

Итак, все виды ионизирующих излучений сами или опосредованно вызывают либо возбуждение, либо ионизацию атомов или молекул биосистем. Однако при облучении объектов разными видами ионизирующей радиации в равных дозах возникают количественно, а иногда и качественно различные биологические эффекты, что связано с пространственным распределением выделяющейся при взаимодействии энергии в облучаемом микрообъеме, т.е. с ЛПЭ.

Линейная передача энергии заряженных частиц возрастает со снижением их скорости, поэтому в конце пробега отдача энергии всякой заряженной частицей максимальна. Эту особенность взаимодействия тяжелых ядерных частиц используют при лечении опухолей, так как она позволяет сосредоточить значительную энергию на глубине пораженной ткани при минимальном ее рассеянии в здоровых тканях по ходу пучка.

Установлено, что ЛПЭ пропорциональна квадрату заряда: α-частица, образующаяся при радиоактивном распаде и имеющая заряд +2, вызывает появление ионов в 4 раза чаще. В воздухе α-частицы в зависимости от начальной энергии образуют 40 000–100 000 пар ионов, а β-частицы – от 30 до 300. Длина пробега частиц возрастает с увеличением их энергии. В настоящее время связь между этими параметрами для каждой частицы точно установлена.

Величина ЛПЭ (кэВ/мкм) зависит от плотности вещества и характеризует распределение энергии, переданной веществу, вдоль трека частицы. Чем выше значение ЛПЭ, тем больше энергии оставляет частица на единицу пути, тем плотнее распределены создаваемые ею ионы вдоль трека.

Зная ЛПЭ, легко определить среднее число ионов, образованных на единицу пути частицы. На одну пару ионов в среднем тратится 34–36 эВ. Если разделить ЛПЭ на энергию для образования одной пары ионов, то получим линейную плотность ионизации (ЛПИ): ЛПИ = = ЛПЭ/34 (т.е. количество пар ионов на 1 мкм пути). ЛПИ является количественной мерой ионизирующей способности ионизирующего излучения. Она равняется числу пар ионов, создаваемых частицей (квантом) на единице пути в веществе.

Линейная плотность ионизации зависит от многих факторов: от скорости, массы и заряда частицы, от энергии квантов, свойств вещества и др. Чтобы избавиться от неопределенности, вносимой свойствами вещества, и характеризовать только свойства ионизирующего излучения, ЛПИ определяют в стандартном веществе – сухом воздухе (табл. 1.5).

Таблица 1.5. **Усредненные значения ЛПИ в воздухе**

Вид излучения	ЛПИ (пар ионов · см$^{-1}$)
α-частицы	40 000
β-частицы	400
Рентгеновские и γ-кванты	5
Протоны	10000

Очевидно, что в других веществах, имеющих другую плотность, значения ЛПИ будут другими. Практический интерес представляет соотношение ЛПИ, измеренной в стандартных условиях (в воздухе) и в тканях человека. Дело в том, что развитие реакции в биологических тканях удобнее прогнозировать, зная степень именно ее ионизации, а не воздуха. Эмпирически установлено, что ЛПИ, измеренная в тканях человека, примерно в 800 раз выше, чем ЛПИ, измеренная в воздухе: $ЛПИ_{тк} \geq 800\ ЛПИ_{возд}$. Естественно, что наибольшее повреждающее действие на живые ткани оказывают излучения, которые создают бóльшую ЛПИ, поскольку каждая пара ионов – разрушенная биомолекула.

Плотность ионизации увеличивается на конце трека частицы. При равной скорости движения частицы уровень ионизации пропорционален квадрату заряда частицы, а при равной энергии плотность ионизации увеличивается при большей массе частицы.

Контрольные вопросы

1. Какие процессы лежат в основе радиобиологического эффекта?
2. Какая величина является критерием эффективности биологического действия ИИ? В каких единицах она измеряется?
3. Какие типичные уровни ЛПЭ для наиболее распространенных видов излучений вы можете указать?
4. Чем отличаются редкоионизирующие излучения от плотноионизирующих?
5. Почему ЛПЭ заряженных частиц возрастает со снижением их скорости? От каких факторов зависит величина ЛПЭ?
6. Как можно определить среднее число ионов, образованных на единицу пути частицы?
7. От каких факторов зависит величина ЛПИ? В каких единицах она измеряется?
8. Какое вещество является стандартом для определения ЛПИ? Какие примеры вы можете привести?
9. Насколько отличается ЛПИ, измеренная в тканях человека, от ЛПИ, измеренной в стандартных условиях?
10. Почему плотность ионизации увеличивается на конце трека частицы?
11. Различается ли плотность ионизации у частиц, имеющих равный заряд, но различный размер? Почему?

1.4.1. Проникающая способность ионизирующих излучений

Глубина проникновения ионизирующего излучения зависит, с одной стороны, от природы излучения, заряда составляющих его частиц и энергии, а с другой – от состава и плотности облучаемого вещества.

Ионизирующие электромагнитные излучения обладают большой проникающей способностью. Проникающая способность ионизирующего излучения – это скорость (темп) потери энергии в веществе. Она обратно пропорциональна ионизирующей способности (т.е. ЛПИ): чем больше ионов создает частица на единице длины своего пробега в веществе, тем быстрее она теряет энергию.

Альфа-частицы не обладают большой проникающей способностью: даже в воздухе их пробег исчисляется несколькими сантиметрами. Более плотные вещества (ткань, дерево, бумага) полностью задерживают α-частицы при толщине слоя 0,1 мм.

Проникающая способность β-частиц примерно в 100 раз больше: в воздухе они проходят несколько метров, в твердых средах – порядка нескольких миллиметров.

Рентгеновские лучи и γ-кванты, имеющие малую ЛПИ, медленно теряют энергию и поэтому проникают глубоко даже в плотные среды (грунт, бетон и т.д.). Конкретные значения глубины проникновения γ- и рентгеновских квантов в одно и то же вещество зависят от их энергии. С увеличением энергии квантов растет и проникающая способность. Жесткие γ-кванты (с большой энергией) могут преодолевать слой бетона в несколько метров.

Ослабление γ-излучения в веществе характеризуется коэфициентом ослабления фотонов μ. В табл. 1.6 приведены значения линейного коэффициента поглощения γ-излучения (μ) для четырех веществ – воздуха, воды (значения μ для биологических тканей близки к его величине для воды), железа и свинца – и зависимость этого коэффициента от энергии излучения.

Таблица 1.6. **Зависимость линейного коэффициента поглощения γ-излучения различных веществ μ от его энергии, см$^{-1}$**

Энергия γ-излучения, МэВ	Линейный коэффициент поглощения γ-излучения различных веществ μ			
	в воздухе	в воде	в железе	в свинце
0,1	19,8	0,172	2,8	59,9
0,25	14,6	0,126	0,82	6,3
0,5	11,1	0,096	0,65	1,67
1,0	8,1	0,070	0,45	0,75
2,0	5,7	0,050	0,33	0,51
3,0	4,6	0,039	0,28	0,46
5,0	3,6	0,030	0,24	0,48
10,0	2,6	0,022	0,23	0,62

Для ослабления пучка рентгеновских лучей с энергией 250 кэВ в 100 раз достаточно 7–8 мм свинца, обладающего большой поглощающей способностью и поэтому используемого в качестве экрана для защиты от вредного действия излучений. Более легкие металлы (Al, Cr, Fe) используют в качестве фильтров, отсекающих очень мягкую компоненту рентгеновских лучей, сильно поглощающуюся в веществе (большое μ) и вызывающую лучевой ожог кожи.

Величина ЛПЭ – важнейшая радиобиологическая характеристика излучения, показатель его биологической эффективности, или, как иногда говорят, качества.

Физическая природа частиц или квантов не сказывается на специфике биологического действия, например при равных ЛПЭ наблюдают одинаково эффективное подавление размножения клеток как в результате рентгеновского облучения, так и при действии α-частиц.

Одно и то же количество энергии можно сообщить биологическому объекту при облучении различными типами ионизирующих частиц. Поскольку число возбуждений и ионизаций определяется величиной поглощенной дозы излучения, можно было бы ожидать, что различные виды ионизирующих излучений приводят к одному и тому же биологическому эффекту при условии, что объект поглотил одинаковую дозу излучения. В действительности это не так.

Следовательно, интегральная поглощенная доза, по величине которой судят о суммарном числе образованных возбуждений и ионизаций, не может использоваться для сопоставления эффективности различных типов излучения. Точно так же не совпадает со степенью конечного биологического эффекта величина энергии ионизирующих частиц.

Для того чтобы представить возможную причину различной эффективности излучений с высокими и низкими значениями ЛПЭ, рассмотрим следующие ситуации:

- α-частицы, обладающие энергией 4 МэВ, передают веществу 130 кэВ на 1 мкм пути, что соответствует примерно 3800 ионизациям на 1 мкм. При такой высокой плотности ионизации в масштабе белковой молекулы частица может произвести несколько следующих друг за другом актов ионизации и возбуждения;
- электроны с энергией 0,5 МэВ имеют величину ЛПЭ = 0,2 кэВ/мкм. Такие электроны образуют около шести пар ионов на 1 мкм пути, т.е. вероятность возникновения ионизации в пределах белковой молекулы толщиной около 0,003 мкм весьма мала.

При облучении клеток ионизирующими излучениями величина поглощенной дозы показывает лишь среднее количество энергии, переданной облучаемой системе. О плотности ионизации в клетке можно судить по величине ЛПЭ. Если движущаяся частица производит

ионизации, значительно удаленные друг от друга, то вероятность возникновения нескольких ионов в пределах макромолекулы, субклеточной органеллы или клетки в целом сравнительно невелика.

Напротив, когда акты ионизации следуют непрерывно вдоль трека частицы, можно ожидать возникновения многих ионов в пределах одной субклеточной структуры, например двух ионизаций в комплементарных участках двухнитевой молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Конечно, биологические последствия поражения (в результате ионизации) обеих нитей этой уникальной молекулярной структуры значительно ощутимее для клетки, чем разрушение какого-либо участка одной спирали ДНК при сохранении целостности комплементарной цепи. Поскольку с ростом линейной плотности ионизации возрастает вероятность именно такого «двухнитевого разрыва», ясно, что плотноионизирующие частицы (с высокой ЛПЭ) должны значительно эффективнее поражать ДНК и связанные с ней клеточные функции, чем редкоионизирующие.

Контрольные вопросы

1. От каких факторов зависит проникающая способность ИИ?
2. Как различается проникающая способность α-, β-, γ-излучений в различных средах? Какой таблицей можно проиллюстрировать ответ?
3. В каких единицах измеряется линейный коэффициент поглощения ИИ в различных веществах?
4. Как можно проанализировать данные табл. 1.6? От каких факторов зависит линейный коэффициент поглощения γ-излучения?
5. В чем причина различной эффективности излучений с высокими и низкими значениями ЛПЭ? Какие примеры вы можете привести?

1.4.2. Относительная биологическая эффективность различных видов излучения. Связь ОБЭ с ЛПЭ

Для сравнительной количественной характеристики биологического действия различных видов излучения определяют их *относительную биологическую эффективность* (ОБЭ). Необходимо заметить, что ОБЭ в основном определяется ЛПЭ и связана с нею определенной зависимостью. ОБЭ излучения представляет собой относительную по сравнению с рентгеновским излучением его способность при равной поглощенной дозе вызывать лучевое поражение определенной выраженности (степени).

На различных биологических объектах было проведено сопоставление эффективности различных типов ионизирующих частиц. В опытах на млекопитающих критерием эффективности служило летальное действие излучений, а также различные отдаленные эффекты,

такие как появление лучевых катаракт и злокачественных опухолей, снижение продолжительности жизни.

При облучении клеток одинаковыми дозами радиации, сообщенными различными типами ионизирующих частиц, подсчитывали число индуцированных облучением хромосомных аберраций и мутаций. Эти и другие эксперименты позволили количественно оценить эффективность различных видов ионизирующих излучений и ввести коэффициенты, которые для каждой конкретной биологической системы показывают эффективность данного типа излучения по сравнению с выбранным стандартным излучением.

Коэффициент относительной биологической эффективности. Количественной оценкой ОБЭ излучения служит коэффициент ОБЭ ($K_{ОБЭ}$), который представляет собой отношение дозы данного и стандартного излучений, обладающих равным биологическим эффектом при прочих равных условиях облучения (равномерность распределения поглощенной дозы в организме, дробность облучения, мощность дозы и т.д.).

Величина $K_{ОБЭ}$ определяется из соотношения

$$K_{ОБЭ} = \frac{\text{Биологическая эффективность исследуемого излучения}}{\text{Биологическая эффективность рентгеновского излучения с энергией примерно 200 КэВ}}.$$

Как видно из соотношения, в качестве стандартного выбирают рентгеновское излучение с энергией квантов 200 кэВ, которое образует примерно 100 пар ионов на 1 мкм пути в воде. Для такого излучения ОБЭ принимают равной единице.

Для каждой изучаемой системы коэффициент $K_{ОБЭ}$ находят путем сопоставления эффектов стандартного и исследуемого излучений, примененных в одинаковой дозе. При этом необходимо учитывать, что значение ОБЭ может изменяться в зависимости от того, однократно или дробно поглощалась одна и та же мощность дозы. Желательно, чтобы сравниваемые виды излучения имели одинаковую кинетику действия на выбранную тест-систему.

Для расчетов различных санитарных норм принимают относительные величины ОБЭ, которые являются усредненными результатами экспериментов на различных системах. Эти величины приведены в табл. 1.7.

Таблица 1.7. **$K_{ОБЭ}$ для некоторых α-частиц с определенной ЛПЭ**

$ЛПЭ_{\alpha}$, кэВ/мкм	< 3,5	7	23	53	> 175
$K_{ОБЭ}$	1	2	5	10	20

На рис. 1.6 представлена кривая зависимости ОБЭ излучения от ЛПЭ.

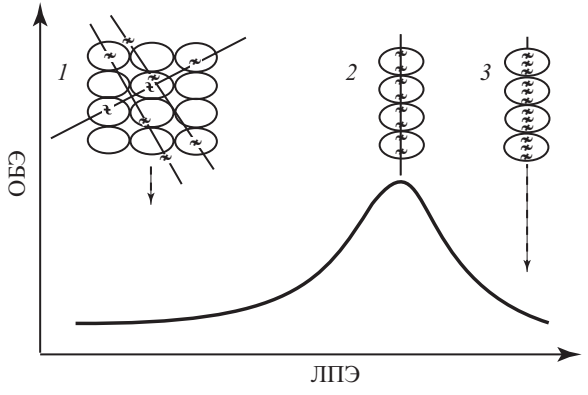

Рис. 1.6. Кривая зависимости относительной биологической эффективности излучения от линейной передачи энергии:
1 – фотоэффект; *2* – эффект Комптона; *3* – образование электрон-позитронных пар

Установлено, что при значениях ЛПЭ выше 90–100 КэВ/мкм кривая зависимости ОБЭ от ЛПЭ проходит максимум и снижается. Возможно, это связано с тем, что уже при значениях ЛПЭ = 100 КэВ/мкм в клетке возникает критическое число ионизаций, достаточное для ее гибели. Дальнейшее увеличение плотности ионизации неэффективно. При этом каждая последующая частица ионизирующего излучения теряет свою энергию в уже погибшей клетке. Следовательно, энергия ионизирующего излучения расходуется вхолостую, а его удельная эффективность, несмотря на высокие значения ЛПЭ, падает.

Таким образом, после оптимального значения ЛПЭ (максимум пораженных мишеней на единицу дозы) наступает эффект «перепоражения» (overkill).

Связь ОБЭ с ЛПЭ ионизирующего излучения на практике оказывается гораздо более сложной.

Абсолютная величина ОБЭ не является постоянной, а зависит от степени поражения, т.е. от дозы облучения. С возрастанием дозы облучения снижается ОБЭ.

Таким образом, один и тот же биологический эффект может быть достигнут при фракционированном облучении в меньших суммарных дозах плотноионизирующего облучения (по сравнению с суммарной дозой редкоионизирующего облучения), чем при однократном облучении (рис. 1.7).

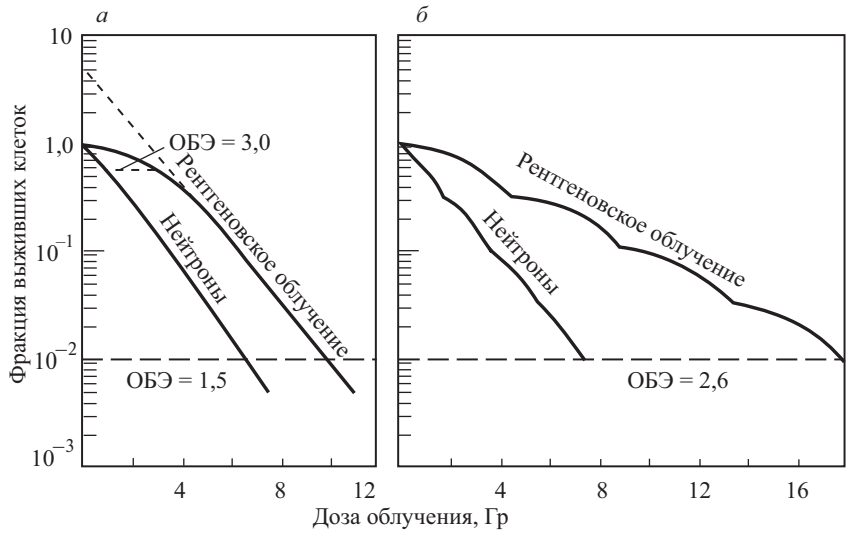

Рис. 1.7. Зависимость ОБЭ от дозы при однократном (*а*) и фракционированном (*б*) облучении

Это явление используется при лучевой терапии опухолей с использованием плотноионизирующих излучений, характеризующихся большой ЛПЭ.

Контрольные вопросы

1. Как определяется и что характеризует ОБЭ?
2. Для каких целей предназначен коэффициент ОБЭ?
3. Как можно охарактеризовать зависимость относительной биологической эффективности излучения от линейной передачи энергии?
4. Какое явление используется при лучевой терапии опухолей с использованием плотноионизирующих излучений, характеризующихся большой ЛПЭ?

1.5. Дозиметрические величины, используемые в радиобиологии

Практика контроля профессионального облучения опирается на современную систему дозиметрических величин и международный опыт безопасного развития радиационно-опасных технологий. По мере совершенствования нашего знания об эффектах ионизирующего излучения изменяется система обеспечения радиационной безопасности, а вместе с ней и практика контроля профессионального облучения.

Регулярно публикуемые доклады Международной комиссии по радиационным единицам (МКРЕ) и Рекомендации Международной комиссии по радиациологической защите (МКРЗ) отражают этот процесс и позволяют рассматривать современную систему дозиметрических величин как систему, состоящую из трех больших разделов:

• *базовые физические величины*, являющиеся мерой воздействия ионизирующего излучения на вещество;

• *нормируемые величины*, являющиеся мерой ущерба (вреда) от воздействия излучения на человека;

• *операционные величины*, являющиеся непосредственно определяемыми в измерениях величинами, предназначенными для оценки нормируемых величин при радиационном контроле.

Кроме того что базовые физические величины являются мерой физического воздействия ионизирующего излучения на вещество, они также характеризуют источник *излучения*, само *излучение* и *радиационные поля*, возникающие при прохождении излучения через вещество.

Для описания облучения (воздействия излучения на человека) физические дозиметрические величины напрямую не используют. Облучение характеризуют нормируемые дозиметрические величины, в определении которых используются соподчиненные базовые физические величины. Измерение нормируемых величин при контроле облучения практически невозможно.

В оценке соответствия условий облучения нормативным требованиям используются операционные величины, значения которых при определенных условиях облучения близки к значениям соответствующих нормируемых величин. Важнейшим качеством операционных величин является то, что они могут быть непосредственно измерены при радиационном контроле.

Контрольные вопросы

1. На что опирается практика контроля профессионального облучения?
2. В каких документах рассмотрена современная система дозиметрических величин?
3. Из каких разделов состоит современная система дозиметрических величин?
4. Что характеризуют базовые физические величины?
5. Чем отличаются нормируемые величины от опрерационных величин?

1.5.1. Базовые физические величины

Базовые физические величины, которые характеризуют источники излучения, радиационные поля и взаимодействие излучения с веществом, составляют раздел дозиметрических величин, который остается

неизменным в течение долгого времени. Вслед за введением в практику Международной системы единиц (СИ) меняются единицы измерения базовых физических величин, однако их определения остаются неизменными.

Базовыми физическим величинами являются: активность нуклидов, флюенс частиц, плотность потока частиц, поглощенная доза, керма (K), величина линейной передачи энергии.

Явление радиоактивности было открыто в 1896 г. С тех пор вещество, имеющее в своем составе радиоактивные изотопы (радионуклиды), называют радиоактивным. Такое вещество рассматривают как радионуклидный источник ионизирующего излучения. Главной характеристикой радионуклидного источника является его активность (A) – мера радиоактивности какого-либо количества радионуклида, находящегося в данный момент времени в определенном энергетическом состоянии. Ожидаемое число ядер радионуклида, претерпевших спонтанные ядерные превращения в единицу времени, пропорционально полному числу ядер N этого радионуклида:

$$A = -\frac{dN}{dt} = \lambda N,$$

где dN – ожидаемое число спонтанных ядерных превращений из данного энергетического состояния, происходящих за промежуток времени dt; λ – постоянная радиоактивного распада, характеризующая вероятность распада ядра атома данного нуклида в единицу времени.

Единица измерения активности – беккерель (Бк). В источнике с активностью 1 Бк в среднем происходит одно спонтанное ядерное превращение в 1 с (1 Бк = 1 расп/с). Использовавшаяся ранее внесистемная единица измерения активности кюри (Ки) составляет $3{,}7 \cdot 10^{10}$ Бк.

Важными характеристиками потока излучения при его переносе в среде от источника к облучаемому объекту являются:

• *флюенс частиц* (Ф) – отношение числа частиц dN, проникающих в элементарную сферу, к площади центрального сечения dS этой сферы. Единица измерения флюенса частиц (квантов) излучения – част/см^2;

• *плотность потока частиц* (*квантов*) *излучения* – флюенс за единицу времени. Единица измерения плотности потока частиц (квантов) излучения – част/(см^2·с).

Энергия является важнейшей характеристикой ионизирующего излучения. В ядерной физике используется внесистемная единица энергии – электронвольт (эВ); 1 эВ = $1{,}6020 \cdot 10^{-19}$ Дж.

Первоначально развитие дозиметрии определялось необходимостью защиты от воздействия рентгеновского и γ-излучений природных радиоактивных веществ при медицинском применении ионизирующих

излучений. Ионизация среды под воздействием этих излучений явилась первым физическим эффектом, который был сопоставлен с биологическим эффектом излучения.

Для оценки поля фотонного излучения в воздухе применяют величину экспозиционной дозы. Экспозиционная доза является мерой ионизационного действия фотонного излучения, определяемой по ионизации воздуха в условиях электронного равновесия. Непосредственно измеряемой физической величиной при определении экспозиционной дозы фотонного излучения является суммарный электрический заряд ионов одного знака, образованных в воздухе за время облучения.

Для фотонов с энергией менее 3 МэВ воздух служит хорошей моделью мышечной ткани при оценке ионизационного эффекта. Экспозиционная доза определяется как концентрация ионов одного знака в воздухе и равна отношению суммарного заряда всех ионов одного знака, созданных в воздухе излучением при полном торможении вторичных электронов и позитронов, образующихся в элементарном объеме, к массе воздуха в этом объеме. Единица измерения экспозиционной дозы – один кулон на килограмм (Кл/кг). Внесистемная единица измерения экспозиционной дозы – рентген (Р); 1 Р = $2{,}58 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг.

Начиная с 1990 г. согласно нормативным документам термин «экспозиционная доза» подлежит изъятию из употребления. Это обусловлено тем, что данная величина может испльзоваться только для оценки в сухом атмосферном воздухе уровня фотонного излучения (γ-излучения, рентгеновского излучения) с энергией менее 3 МэВ. Также для перевода единицы экспозиционной дозы рентгена (Р) в Международную систему СИ используются неудобные коэффициенты, что может приводить к ошибкам при расчетах.

С открытием нейтрона и деления ядер возникли новые мощные источники излучения: потоки нейтронов, ускоренных электронов, позитронов и тяжелых заряженных частиц. Необходимость защиты от воздействия различных излучений привела к созданию универсальной энергетической концепции, применимой к любым видам ионизирующего излучения и ко всем средам.

Поглощенная доза излучения D была введена как основная дозиметрическая величина, которая является мерой энергии, переданной ионизирующим излучением веществу:

$$D = \frac{d\,\bar{\varepsilon}}{dm},$$

где $d\,\bar{\varepsilon}$ – средняя энергия, переданная ионизирующим излучением веществу, находящемуся в элементарном объеме; dm – масса вещества в этом объеме. Поглощенная доза отражает концентрацию энергии из-

лучения, переданной веществу. Единица измерения поглощенной дозы – грей (Гр); 1 Гр = 1 Дж/кг. Использовавшаяся ранее внесистемная единица рад равна 0,01 Гр.

Для оценки воздействия на среду косвенно ионизирующих излучений используют понятие кермы. Керма – отношение суммы начальных кинетических энергий $d\varepsilon_{\text{К}}$ всех заряженных ионизирующих частиц, образовавшихся под действием косвенно ионизирующего излучения в элементарном объеме вещества, к массе dm вещества в этом объеме:

$$\text{К} = \frac{d\varepsilon_{\text{К}}}{dm}.$$

Единица измерения кермы – грэй – совпадает с единицей поглощенной дозы. Единичная поглощенная доза (1 Гр) равна керме, при которой сумма начальных кинетических энергий всех заряженных ионизирующих частиц, образовавшихся под действием косвенно ионизирующего излучения в веществе массой 1 кг, равна 1 Дж.

Керма определяется кинетической энергией вторичных заряженных частиц, в том числе и той ее частью, которая расходуется затем на тормозное излучение. Керма и поглощенная доза фотонного излучения равны друг другу в той степени, в какой достигается равновесие заряженных частиц и в какой можно пренебречь тормозным излучением вторичных электронов и позитронов, а также ослаблением потока первичных фотонов на пути пробега вторичных электронов.

Следовательно, значение кермы для фотонов в условиях электронного равновесия совпадает с поглощенной дозой с погрешностью, определяемой долей энергии вторичных заряженных частиц, которая расходуется на тормозное излучение. Для энергий фотонов радионуклидных источников ($E_{\gamma} \leq 3$ МэВ) значение кермы в воздухе может превышать значение поглощенной дозы в воздухе не более чем на 1%. В биологической ткани керма уменьшается с глубиной из-за ослабления первичного излучения. Таким образом, максимум кермы фотонного излучения наблюдается на поверхности тела человека.

Керма нейтронов совпадает с поглощенной дозой от вторичных заряженных частиц в условиях их равновесия. Для объема вещества достаточно большой массы, который окружен таким же веществом (орган внутри тела человека), когда соблюдается условие равновесия заряженных частиц, керма обычно практически (здесь и далее слово «практически» напоминает, что утверждение справедливо, если можно пренебречь потерями энергии вторичных заряженных частиц на образование тормозного излучения) совпадает с поглощенной дозой от вторичных заряженных частиц.

Для тонких слоев вещества на границе раздела различных сред (кожа на границе раздела воздух – тело человека) эти дозиметрические характеристики различаются. Для нейтронов в условиях равновесия заряженных частиц поглощенная доза практически может быть представлена как сумма кермы и поглощенной дозы от вторичного γ-излучения. Поэтому керма на единичный флюенс нейтронов меньше поглощенной дозы на единичный флюенс. Это различие особенно заметно в области промежуточных энергий, где значителен вклад в поглощенную дозу от вторичного γ-излучения.

Размерность поглощенной дозы и кермы отлична от размерности экспозиционной дозы. Эти величины имеют различную природу. Керму фотонного излучения в воздухе рассматривают как энергетический эквивалент экспозиционной дозы. Поскольку 1 Р соответствует образованию $2{,}08 \cdot 10^9$ пар ионов в 1 см^3 воздуха, то, принимая энергию образования пары ионов в воздухе равной 34 эВ, получаем соотношение, при котором 1 Р соответствует керме фотонов в воздухе, равной примерно $8{,}8 \cdot 10^{-3}$ Гр.

Важной характеристикой ионизирующего излучения, показывающей, как передает излучение свою энергию веществу, является *линейная передача энергии* – энергия, переданная ионизирующей частицей веществу в заданной окрестности ее траектории на единицу длины траектории. Как правило, в радиационной безопасности под линейной передачей энергии (ЛПЭ, или L) излучения подразумевают полную передачу энергии в воде:

$$L = \left(\frac{d\varepsilon_{\text{ср}}}{dl} \right),$$

где dl – путь, пройденный заряженной частицей в веществе; средняя энергия, потерянная частицей во взаимодействиях. Как будет показано ниже, учет этой характеристики излучения позволяет единым образом описать биологическое действие различных излучений, например излучений, состоящих из фотонов и α-частиц.

Контрольные вопросы

1. Что характеризуют базовые физические величины? Какие из них вы можете перечислить?
2. Какая величина является главной характеристикой радионуклидного источника и в каких единицах она измеряется?
3. Какие показатели являются важными характеристиками потока излучения и в каких единицах они измеряются?

4. Какая величина применяется для оценки поля фотонного излучения в воздухе и в каких единицах она измеряется?
5. Для чего была введена такая величина, как поглощенная доза излучения, и в каких единицах она измеряется?
6. В каких целях используется понятие кермы? В каких единицах измеряется керма?
7. Чем размерность поглощенной дозы и кермы отличается от размерности экспозиционной дозы?
8. Какая характеристика излучения позволяет единым образом описать биологическое действие различных излучений?

1.5.2. Нормируемые величины

Нормируемые дозиметрические величины характеризуют облучение человека, т.е. воздействие на него ионизирующего излучения. Их определение служит задачам обеспечения радиационной безопасности человека. К нормируемым величинам относятся эквивалентная доза, эффективная доза, коллективная эффективная доза.

Основой радиационной безопасности является радиационная биология человека и животных, которая базируется на данных радиобиологических экспериментов и многолетних эпидемиологических исследований эффектов облучения в группах облученных людей. Биологические эффекты облучения в значительной степени определяются свойствами самого облучаемого объекта. Поэтому радиобиологические эксперименты на животных служат для исследования общих закономерностей радиационного поражения, а фактической (экспериментальной) базой радиационной безопасности является многолетнее наблюдение за группами облученных людей.

В начале XX в. такой наблюдаемой группой были врачи-радиологи; после Второй мировой войны – жители Хиросимы и Нагасаки, пострадавшие вследствие военного применения ядерного оружия; жертвы радиационных аварий; больные, подвергавшиеся терапевтическому облучению; профессиональные работники атомной энергетики и промышленности.

Цель этих исследований – выявление закономерностей действия ионизирующего излучения в области малых доз хронического облучения, характерных для условий нормальной эксплуатации источников излучения. Результат таких исследований – выработка научных концепций ограничения вредного действия ионизирующего излучения на человека без чрезмерного ограничения практического применения источников. С изменением концепций менялись и основные нормируемые величины. В настоящее время это поглощенная доза, эквивалентная доза и эффективная доза.

По мере изучения биологических эффектов излучения и развития атомной энергетики и промышленности развивались концепции радиационного нормирования профессионального облучения. До конца 70-х гг. XX в. в основе радиационного нормирования лежала концепция предотвращения детерминированных эффектов излучения, которая опиралась на гипотезу порогового действия излучения. Этот период был связан с бурным развитием атомной науки и техники, главным образом в оборонной сфере, которое происходило в условиях недостатка знаний о биологическом действии излучений и несовершенства радиационных технологий, что приводило к значительным дозам облучения. Развитие атомной энергетики, а также других направлений коммерческого использования источников ионизирующего излучения потребовало новых подходов к обеспечению радиационной безопасности, позволяющих проведение оптимизации радиационной защиты в условиях совершенствования технологий обращения с источниками и роста числа профессиональных работников. В конце 1970-х гг. в основу нормирования была положена концепция ограничения вероятности преждевременной смерти вследствие возникновения стохастических эффектов излучения, которая опиралась на гипотезу беспорогового действия излучения. С 1990-х гг. на смену этой концепции пришла концепция ограничения ущерба вследствие возникновения стохастических эффектов излучения, которая была сформулирована в Рекомендациях МКРЗ 1990 г.

Международная комиссия по радиационным единицам определяет ущерб как «сложное понятие, сочетающее вероятность, степень тяжести эффекта и время его проявления», величину которого можно выразить в числе лет полноценной жизни, потерянных в результате заболевания или преждевременной смерти, вызванных воздействием ионизирующего излучения. При определении ущерба в результате облучения учитывается:

- вероятность преждевременной смерти в результате реализации смертельного рака за все время ожидаемой жизни или тяжелого генетического нарушения, которое приводит к преждевременной гибели потомков облученных лиц в первых двух поколениях;
- вклад в ущерб от несмертельных (излечиваемых) случаев рака как реализации стохастических эффектов облучения;
- продолжительность потерянных лет полноценной жизни в результате реализации тех или иных стохастических эффектов.

Радиобиологические исследования показали, что в области малых доз один и тот же радиобиологический эффект облучения какого-либо органа или ткани может наблюдаться при различных поглощенных дозах, если на орган или ткань воздействуют ионизирующие излучения различной природы. Для описания этих различий было введено понятие

ОБЭ. Многочисленными исследованиями было показано, что при облучении одних и тех же биологических объектов ОБЭ излучения зависит от конкретного эффекта, условий облучения, вида излучения, его энергии и интенсивности.

Для одного и того же биологического эффекта, например выживаемости определенной доли облученных клеток, ОБЭ зависит от ЛПЭ и близка для различных видов излучений с равными ЛПЭ. Как правило, чем выше ЛПЭ частиц, тем выше их биологическая эффективность. При этом зависимость ОБЭ от ЛПЭ излучения оказалась различной для разных биологических эффектов. Последнее обстоятельство фактически сделало невозможным прямое использование ОБЭ в радиационной безопасности. Применительно к хроническому облучению людей в малых дозах МКРЗ в Рекомендациях 1990 г. предлагает использовать две величины, производные от ОБЭ, – взвешивающий коэффициент для излучения W_R и средний коэффициент качества излучения $\bar{Q}$. Области применимости этих величин характеризует табл. 1.8.

Таблица 1.8. **Величины, характеризующие излучения**

Величина / область ее использования	Свойства	Метод определения
ОБЭ / радиобиология	Характеризует облучение в зависимости от его свойств, свойств биологического объекта и изучаемого биологического эффекта	Определяется в радиобиологическом эксперименте
W_R / радиационная безопасность (ограничение облучения)	Характеризует воздействие источника излучения на человека в зависимости от свойств излучения, падающего на тело человека (внешнее облучение) или возникающего при ядерном превращении радиоактивных ядер внутри тела человека (внутреннее облучение)	Устанавливается на основе обобщения значений ОБЭ для стохастических эффектов и трансформации клеток млекопитающих *in vitro*
Q / радиационная безопасность (радиационный контроль)	Характеризует передачу энергии излучения биологической ткани в зависимости от распределения поглощенной дозы по ЛПЭ в точке взаимодействия излучения с веществом	Зависимость $Q(L)$ устанавливается на основе согласования с установленными значениями W_R

Взвешивающий коэффициент излучения используется в определении нормируемой величины эквивалентной дозы облучения органа или ткани. Установленная МКРЗ зависимость W_R от энергии и вида излучения является результатом обобщения имеющихся радиобиологических данных об ОБЭ излучений в отношении возникновения радиогенных раков различной локализации у млекопитающих и злокачественной трансформации клеток млекопитающих *in vitro*.

Взвешивающие коэффициенты относятся к внешнему излучению, падающему на поверхность тела, а в случае внутреннего облучения – к излучению, испускаемому при ядерном превращении радионуклидов, попавших в организм. Для фотонов (рентгеновского излучения и γ-излучения) $W_R = 1$, для других излучений $W_R \geq 1$.

В отличие от значений ОБЭ, которые определены только для конкретного биологического эффекта, облучаемого объекта и условий облучения, установленные значения взвешивающего коэффициента излучения нельзя соотнести с каким-либо определенным эффектом облучения человека. Являясь обобщением большого объема экспериментальных данных, значения W_R характеризуют вероятность возникновения некоторого стандартного стохастического эффекта при воздействии излучений различной природы на стандартного человека в условиях хронического облучения в области малых доз.

Взвешивающий коэффициент излучения равен отношению дозы рентгеновского или γ-излучения к дозе данного излучения, при которых равны вероятности возникновения стандартного стохастического эффекта при облучении стандартного человека.

Разные органы тела человека по-разному экранируются другими частями человеческого тела, что приводит к существенной разнице между эквивалентными дозами их облучения. Вот почему указание на облучаемый орган является существенным в определении эквивалентной дозы облучения органа (equivalent dose in organ). Эту величину необходимо отличать от эквивалентной дозы, использовавшейся до последнего времени в русскоязычной научной и нормативной литературе. Русскоязычный термин «эквивалентная доза» является неверным переводом англоязычного термина, обозначающего эквивалент дозы (doseequivalent).

Ожидаемая эквивалентная доза облучения органа или ткани. Важной величиной, введенной в практику радиационной безопасности Рекомендациями МКРЗ 1990 г., является ожидаемая эквивалентная доза внутреннего облучения органа или ткани – $H_T(\tau)$. Эта величина – аналог эквивалентной дозы внешнего излучения при облучении отдельной ткани или отдельного органа человека источниками внутреннего излучения. К сожалению, в переводе этого термина, принятом в русскоязычной литературе, утерян содержащийся в изначальном английском

термине смысл завершенности действия (облучения) и неотвратимости его последствий: committed equivalent dose – дословно «неизбежная эквивалентная доза».

«Неотвратимость» последствий при внутреннем облучении означает следующее. Поступление радиоактивного вещества в организм приводит к облучению органов и тканей в течение длительного времени. В отличие от внешнего облучения доза внутреннего облучения органа или ткани формируется в течение длительного времени после поступления радиоактивного вещества в организм. Управлять этим процессом после проникновения радиоактивного вещества в организм практически невозможно. Используя закономерности биокинетики радионуклидов, можно только предсказать величину мощности дозы в отдельных органах тела условного человека в различные моменты времени. Эти особенности внутреннего облучения позволяют рассматривать поступление радиоактивного вещества в организм как событие, за которым неотвратимо следует облучение органов и тканей и, как следствие, возможное причинение ущерба. Ожидаемая эквивалентная доза определена как временной интеграл мощности эквивалентной дозы в органе или ткани, которая формируется в течение некоторого времени τ после поступления радиоактивного вещества в организм стандартного человека:

$$H_T(\tau) = \int_{t_0}^{t_0+\tau} H_\tau(t)\,dt,$$

где t_0 – момент поступления, а $H_T(\tau)$ – мощность эквивалентной дозы в органе или ткани к моменту времени t. Значение τ соответствует ожидаемой оставшейся продолжительности жизни человека (рис. 1.8).

Для стандартизации дозиметрических расчетов принято, что τ = 50 лет для взрослых людей старше 20 лет и $\tau = (70 - t_0)$ лет для детей и лиц моложе 20 лет. Единица измерения ожидаемой эквивалентной дозы – зиверт (Зв).

Для целей обеспечения радиационной безопасности за время причинения ущерба человеку в результате внутреннего облучения его органов или тканей принимают момент поступления радиоактивного вещества в

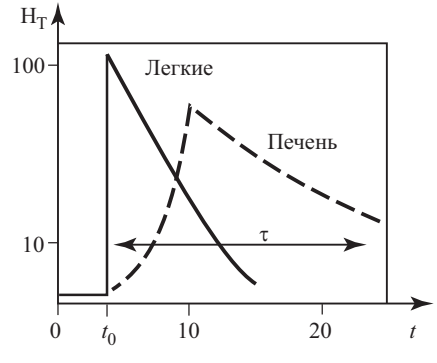

Рис. 1.8. Определение ожидаемой эквивалентной дозы внутреннего облучения органа или ткани

организм; при этом ожидается, что реализация ущерба в виде того или иного эффекта излучения может произойти в течение всей оставшейся жизни человека. Тем самым приводятся к единой мере разные по протяженности во времени облучения. При равенстве величин H_T и $H_T(\tau)$ следует ожидать в течение оставшейся жизни одинаковые последствия внешнего и внутреннего облучений.

Эффективная доза. Является мерой ущерба, причиненного человеку в результате облучения всего тела или нескольких органов и тканей. Эффективная доза определена как величина, приводящая все возможные случаи пространственно не однородного (внешнего или внутреннего) облучения тканей и органов тела стандартного человека к эквивалентному по ущербу равномерному облучению всего тела. Облучению с равными эффективными дозами соответствуют равные ущербы.

В случае внешнего облучения эффективная доза $E^{внеш}$ определяется как сумма произведений эквивалентных доз H_T на соответствующие тканевые весовые множители W_T:

$$E^{внеш} = \sum_T W_T \cdot H_T,$$

где H_T – эквивалентная доза в ткани стандартного человека; W_T – взвешивающий коэффициент для ткани (T) стандартного человека.

Регламентированные числовые значения тканевых весовых множителей W_T установлены примерно равными отношению эквивалентной дозы равномерного облучения всего тела стандартного человека и эквивалентной дозы H_T облучения органа, при которых ожидается один и тот же ущерб вследствие сокращения продолжительности периода полноценной жизни человека в результате возникновения стохастических эффектов, вызванных облучением.

В случае внутреннего облучения эффективная доза называется ожидаемой эффективной дозой $E(\tau)$ и определяется аналогично эффективной дозе внешнего излучения:

$$E(\tau) = \sum_T W_T \cdot H_T(\tau).$$

Для упрощения расчета эффективной дозы в часто встречающихся на практике стандартных условиях облучения используют следующие соотношения:

$$E^{внеш} = \sum_K \Phi(\varepsilon)_R \cdot e(\varepsilon)_R^{внеш},$$

где $\Phi(\varepsilon)_R$ – флюенс излучения R с энергией ε, част/см^2; $e(\varepsilon)_R^{внеш}$ – дозовый коэффициент излучения R, равный эффективной дозе при облучении тела человека потоком излучения R с единичным флюенсом и энергией ε, Зв/(част/см^2);

$$E(\tau) = \sum_{U,G} \Pi_{U,G} \cdot e(\tau)_{U,G}^{внутр},$$

где $\Pi_{U,G}$ – поступление радионуклида U в виде соединения типа G, Бк; $e(\tau)_{U,G}^{внутр}$ – дозовый коэффициент радионуклида U, равный ожидаемой эффективной дозе при поступлении в организм 1 Бк радионуклида U в виде соединения типа G, Зв/Бк.

В системе дозиметрических величин эффективная доза внешнего облучения и ожидаемая эффективная доза внутреннего облучения эквивалентны: ущербы, причиненные источниками внешнего и внутреннего облучения, суммируются. Поэтому годовая эффективная доза равна сумме эффективной дозы внешнего облучения, полученной за год, и ожидаемой эффективной дозы внутреннего облучения, обусловленной поступлением в организм радионуклидов за этот же год. Если не оговаривается иное, эффективной дозой E называют сумму эффективной дозы внешнего облучения и ожидаемой эффективной дозы внутреннего облучения:

$$E = E^{внеш} + E(\tau).$$

Как нормируемая величина эффективная доза является результатом последовательного развития представлений о биологическом действии ионизирующего излучения и поиска меры воздействия ионизирующего излучения, отвечающей целям радиационной безопасности, оценке и ограничению радиогенного ущерба.

Применение этой величины позволяет перейти от измеряемых физических характеристик поля ионизирующего излучения к потенциальному ущербу в качестве меры воздействия излучения на человека, использование которой создает условия для приведения к единому стоимостному знаменателю вреда, затраты и выгоды от использования источников ионизирующего излучения.

Считается, что потенциальный ущерб причинен человеку в момент облучения или поступления в организм радиоактивного вещества, однако его реализация в виде заболевания, приводящего к укорочению продолжительности жизни, является случайным событием и откладывается на неопределенное время, сравнимое с продолжительностью жизни человека. Величину потенциального ущерба рассматривают как «математическое ожидание размера нежелательных последствий, т.е. произведение вероятности и тяжести последствий события (преждевременной смерти в результате облучения)».

Упрощенно величина потенциального ущерба может быть представлена как произведение пожизненной вероятности смерти от радиогенного рака на среднее число лет полноценной жизни, которые могут быть потеряны в результате этого события. Последняя величина лежит в строго ограниченных пределах (10 и 30 лет в зависимости от вида рака, т.е. от того, какой орган облучен) и не зависит от дозы облучения. Чем меньше латентный период развития рака, тем больше лет жизни может быть потеряно и тем больше тяжесть такого эффекта.

В среднем один стохастический эффект (смертельный рак, серьезные наследственные эффекты и несмертельные раки, приведенные по вреду к последствиям от смертельного рака) приводит к сокращению длительности периода полноценной жизни на 15 лет. Вероятность возникновения какого-либо стохастического эффекта зависит от дозы и от того, какой орган облучен, а также от возраста облученного. Анализ имеющихся данных об образовании стохастических эффектов показывает, что при облучении с эффективной дозой 1 мЗв пожизненная вероятность возникновения какого-либо стохастического эффекта, приводящего к преждевременной смерти, равна $6 \cdot 10^{-5}$ и складывается из вероятности реализации потенциального ущерба в виде радиогенного рака ($5 \cdot 10^{-5}$ мЗв) и генетического заболевания ($1 \cdot 10^{-5}$ мЗв).

Таким образом, при прогнозировании последствий облучения отдельного человека мы имеем дело с редкими событиями, имеющими дискретный спектр размеров. Все вышеизложенное указывает на то, что применение эффективной дозы для оценки индивидуального ущерба практически бесполезно, поскольку статистические неопределенности таких оценок громадны.

Эффективная доза, отнесенная к большой группе облученных людей, отражает ожидаемый (в статистическом смысле) ущерб, который связан с облучением членов этой группы. Специальной дозиметрической величиной, предназначенной в области облучения с малыми дозами для оценки коллективного радиологического ущерба, является коллективная эффективная доза S, равная для коллектива из N человек сумме индивидуальных эффективных доз облучения членов этого коллектива $E_1, \ldots, E_N$:

$$S = \sum_{i=1}^{N} E_i .$$

Единица измерения коллективной эффективной дозы – человеко-зиверт (чел.-Зв). Как правило, коллективная доза соотносится с некоторой практической деятельностью и периодом времени, в течение которого эта деятельность приводит к облучению определенной группы людей.

Например, при анализе последствий радионуклидных выбросов годовая коллективная доза облучения населения зоны наблюдения атомной электростанции (АЭС) определяется как сумма годовых эффективных доз облучения жителей зоны от радионуклидов, поступающих в окружающую среду в результате работы АЭС в течение календарного года (под годовой эффективной дозой понимают сумму эффективной дозы внешнего облучения за календарный год и ожидаемой дозы внутреннего облучения от поступления радионуклидов в организм в течение того же года).

Коллективный ущерб определяется как укорочение суммарной длительности периода полноценной жизни членов рассматриваемого коллектива из-за возможного возникновения в облученной группе дополнительных по отношению к фоновому уровню радиогенных стохастических эффектов:

$$G = \Delta t \cdot R_E \cdot S,$$

где Δt – ожидаемое (среднее) число лет сокращения длительности периода полноценной жизни при реализации какого-либо стохастического эффекта облучения, равное 15 годам; R_E – коэффициент вероятности (радиогенный риск) сокращения длительности суммарного (коллективного) периода полноценной жизни в среднем на 15 лет на один стохастический эффект (от смертельного рака, серьезных наследственных эффектов и несмертельного рака, приведенного по ущербу к последствиям от смертельного рака), равный:

- $R_E = 5{,}6 \cdot 10^{-2}$ 1/чел.-Зв – для профессионального облучения;
- $R_E = 7{,}3 \cdot 10^{-2}$ 1/чел.-Зв – для облучения населения.

Коллективная эффективная доза является инструментом для оценки ожидаемого ущерба при облучении больших групп людей. Облучению с коллективной эффективной дозой 1 чел.-Зв соответствует ожидаемый ущерб, равный потере одного года суммарной длительности периода полноценной жизни облученного коллектива.

Контрольные вопросы

1. Какой показатель характеризуют нормируемые дозиметрические величины? Какие из них вы можете перечислить?
2. Какое обстоятельство сделало невозможным прямое использование ОБЭ в радиационной безопасности?
3. От каких параметров зависит ОБЭ излучения при облучении одних и тех же биологических объектов?
4. Какие величины предложила использовать МКРЗ применительно к хроническому облучению людей в малых дозах? Как можно охарактеризовать области применения этих величин? Каковы их свойства и методы определения?

5. Для какой цели используется, в каких единицах измеряется и как рассчитывается эквивалентная доза облучения органа или ткани?

6. Какая величина является аналогом эквивалентной дозы внешнего излучения при облучении отдельной ткани или отдельного органа человека источниками внутреннего излучения?

7. Какая величина введена для оценки меры ущерба, причиненного человеку в результате облучения всего тела или нескольких органов и тканей? Как она рассчитывается?

8. Какая величина предназначена для оценки коллективного радиологического ущерба? Как она рассчитывается и в каких единицах измеряется?

1.5.3. Операционные величины

Как правило, нормируемые величины, в которых выражены основные пределы доз, непосредственно измерить невозможно. Для оценки нормируемых величин при радиационном контроле предназначены операционные величины, которые являются непосредственно определяемыми в измерениях величинами. К операционным величинам относятся индивидуальный эквивалент дозы и амбиентный эквивалент дозы (амбиентная доза).

Введение в практику радиационного контроля операционных величин необходимо в первую очередь для унификации методов контроля и определения требований к функции отклика приборов радиационного контроля.

Операционная величина – величина, однозначно определяемая через физические характеристики поля излучения в точке, максимально возможно приближенная в стандартных условиях облучения к нормируемой величине и предназначенная для консервативной оценки этой величины при дозиметрическом контроле. В общем виде связь между величинами, используемыми в радиационном контроле, представлена на рис. 1.9.

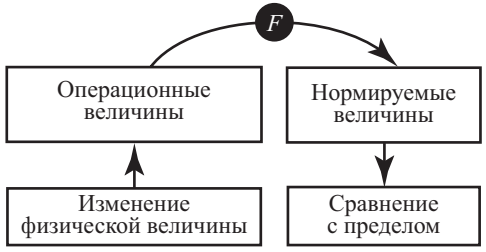

Рис. 1.9. Связь между величинами, используемыми в радиационном контроле

В определении операционных величин внешнего облучения используется *эквивалент дозы* H. Единица измерения эквивалента дозы – Зв.

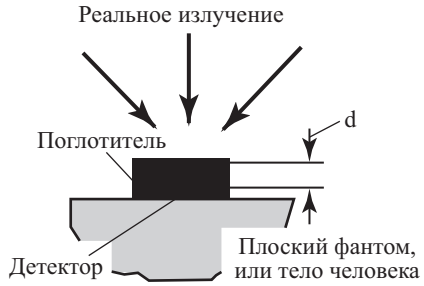

Рис. 1.10. Схема определения индивидуального эквивалента дозы

Взаимодействие излучения с телом человека приводит к изменению самого радиационного поля. Операционные величины определяются таким образом, чтобы результаты их измерения с помощью соответствующих дозиметрических приборов учитывали этот эффект.

Операционной величиной внешнего облучения для индивидуального контроля облучения человека принят *индивидуальный эквивалент дозы* – $H_p(d)$ – эквивалент дозы в мягкой биологической ткани, определяемый на глубине d (мм) под рассматриваемой точкой на поверхности плоского фантома или на теле взрослого человека (рис. 1.10). Использование фантома, или тела человека, в этом случае позволяет напрямую обеспечить учет возмущения реального поля излучения человеком.

Операционной величиной внешнего облучения для контроля радиационной обстановки принят *амбиентный эквивалент дозы* (*амбиентная доза*) H*(d) (перевод англоязычного термина ambient (от лат. ambi – кругом, вокруг, с обеих сторон) doseequivalent – эквивалент дозы, характеризующей радиационную обстановку). Операционные величины для мониторинга радиационной обстановки определяются с использованием концепций *расширения* и *выравнивания* в описании характеристик поля излучения, необходимых для определения характеристик соответствующих дозиметров.

Прибор, измеряющий H*(d) в реальном поле излучения, должен воспроизводить значение эквивалента дозы, который был бы создан в шаровом фантоме МКРЕ на глубине d (в миллиметрах) от поверхности по диаметру, параллельному направлению излучения, если бы такой фантом был помещен в расширенное и выровненное поле излучения (рис. 1.11), идентичное рассматриваемому по составу, флюенсу и энергетическому распределению.

Амбиентный эквивалент дозы используется для характеристики поля излучения в точке, совпадающей с центром такого шарового фантома. Эта величина применительно к реальному полю характеризует консервативную оценку дозы облучения человека. Единица измерения эквивалента амбиентной дозы – Зв.

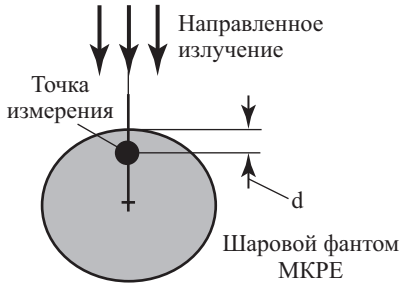

Рис. 1.11. Схема определения амбиентного эквивалента дозы

При определении операционных величин значение d принимается равным 10 мм для контроля величины эффективной дозы, 0,07 мм – для эквивалента дозы облучения кожи, 3 мм – для эквивалента дозы облучения хрусталика глаза.

При введении в практику современной системы обеспечения радиационной безопасности необходимо соблюсти преемственность показателей и единиц измерения дозиметрических величин (табл. 1.9).

Таблица 1.9. **Основные дозиметрические величины и соотношения между ними**

Величина / обозначение	Единица измерения		Соотношение
	СИ	традиционная	
Активность / A	Бк	Ки	1Ки = $3{,}7\cdot10^{10}$ Бк
Энергия излучения R / E_R	Дж	эВ	1эВ = $1{,}602\cdot10^{-19}$ Дж
ЛПЭ / L	Дж/м	кэВ/мкм	1 кэВ/мкм = 62 Дж/м
Керма / K	Гр	рад	1 рад = $1\cdot10^{-2}$ Гр
Поглощенная доза / D	Гр	рад	1 рад = $1\cdot10^{-2}$ Гр
Эквивалентная доза в органе T / H_T	Зв	НП*	Нет
Эффективная доза / E	Зв	НП	Нет
Эквивалент дозы / H	Зв	бэр	1 бэр = $1\cdot10^{-2}$ Зв

*НП не применялась, так как эта величина впервые была введена Рекомендациями МКРЗ 1990 г.

Особое внимание необходимо обратить на интерпретацию результатов измерения тех величин, определения которых претерпели изменения. В первую очередь это относится к эквиваленту дозы. Произошедшее после 1990 г. изменение регламентированной МКРЗ зависимости коэффициента качества от ЛПЭ требует осторожности при анализе данных, полученных с помощью измерительных приборов, в которых была реализована иная зависимость коэффициента качества от ЛПЭ (предложенная Рекомендациями МКРЗ 1977 г.).

Контрольные вопросы

1. Для каких целей введены в практику радиационного контроля операционные величины? Какие из них вы можете перечислить?
2. Чему равен эквивалент дозы и в каких единицах измеряется эта величина?
3. Для каких целей используется индивидуальный эквивалент дозы?
4. Какая величина характеризует консервативную оценку дозы облучения человека? В каких единицах она измеряется и в чем особенность применения этой величины?

Глава 2

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕОРИИ

2.1. Принципы попадания и мишени

Смена представлений в радиобиологии происходила и происходит особенно быстро, так как они в значительной степени связаны с бурным прогрессом ядерной физики и молекулярной биологии. При этом можно наметить два направления в развитии теоретических построений.

Одно из них выражает стремление установить общие, в основном феноменологические, но обязательно количественные закономерности, характеризующие начальные звенья лучевого поражения клетки.

Другое направление объединяет представления, стремящиеся объяснить все многообразие конкретных лучевых реакций биологических объектов; отсюда преимущественно качественный, описательный характер гипотез этого направления.

Указанным теоретическим направлениям присущи определенные преимущества и свои ограничения.

Для разгадки основного радиобиологического парадокса необходимо правильное истолкование несоответствия между ничтожным количеством поглощенной клеткой энергии излучения и вызываемым экстремальным биологическим эффектом. При объяснении этого парадокса в количественной радиобиологии были сформулированы два положения, лежащие в основе так называемой теории мишени.

Первое положение – принцип попаданий – характеризует особенности действующего агента – дискретность поглощения энергии.

Второе положение – принцип мишени – учитывает особенность облучаемого объекта – клетки – ее высокую гетерогенность в морфологическом и функциональном отношениях, а следовательно, различие в ответе на одно и то же попадание.

В конце 1920-х гг. впервые для объяснения радиобиологических феноменов и создания общей теории биологического действия ионизирующих излучений в качестве отправных концепций потребовалось использовать теоретические положения квантовой механики и ядерной физики.

Одним из первых это сделал Ф. Дессауэр в своей теории «точечного нагрева». Ионизирующие излучения обладают малой объемной плотностью, однако отдельные фотоны несут гигантский запас энергии. Исходя из этого, Ф. Дессауэр предположил, что при поглощении системой относительно небольшой общей энергии (смертельная для человека доза облучения вызывает нагрев тела всего на 0,001 °С) некоторые дискретные микрообъемы поглощают настолько большие порции энергии, что действие ионизирующих излучений можно сравнить с микролокальным нагревом, вследствие которого возникают глубокие структурные изменения и в конечном счете биологическое поражение. Вероятностный характер проявления эффекта у отдельных объектов автор гипотезы объяснял статистическим распределением «точечного тепла». Так физический принцип попадания впервые был введен в радиобиологию.

Учитывая наличие в клетке более важных для жизни и менее существенных структур и микрообъемов, а также случайное распределение «точечного тепла», Дессауэр, а позже и ряд других исследователей (дальнейшее развитие связано с работами Дж. Кроутера, Д. Ли, Р. Циммера, Н.В. Тимофеева-Рессовского, В.И. Корогодина) пришли к выводу о том, что исход клеточной реакции зависит от вероятности случайных попаданий дискретных порций энергии именно в эти жизненно важные микрообъемы–мишени. При этом количественные закономерности радиобиологических реакций осуществляются лишь в том случае, если в клетке произошло определенное число попаданий в мишень.

Действительно, при анализе зависимости эффекта от дозы легко обнаруживаются две специфические черты действия ионизирующих излучений:

- большинство клеточных реакций протекает практически при отсутствии порога с нарастанием эффекта при увеличении дозы;
- кривые выживания отражают не столько степень проявления эффекта у отдельных особей (клеток) с повышением дозы, сколько степень увеличения количества (доли) пораженных единиц, т.е. возрастание вероятности проявления регистрируемой реакции.

Иными словами, летальный эффект ионизирующих излучений имеет вероятностный характер вследствие случайного распределения элементарных актов первичного взаимодействия с чувствительными объемами облученных особей.

Достоинством описываемых теоретических представлений о механизме летального действия ионизирующих излучений является простота объяснения основных экспериментальных данных, т.е. количество жизнеспособных единиц с увеличением дозы уменьшается в экспоненциальной зависимости от дозы. Авторы объясняли S-образную форму

кривых выживания в линейных координатах *многоударным процессом* инактивации объектов. При этом имелось в виду, что для инактивации объекта необходимо не одно, а два и более попаданий в единственную мишень или поражение двух и более мишеней, каждая из которых должна быть поражена.

Однако данная теория не объясняет многочисленные экспериментальные факты изменения экстраполяционного числа при применении различных модифицирующих агентов или изменения условий жизнедеятельности объектов, что само по себе не должно сказываться на числе мишеней, и т.д.

Итак, работы этого периода оказали большое влияние на дальнейшее развитие радиационной биологии, превратили ее в одну из самых точных биологических дисциплин. Математический аппарат, развитый в этих работах, позволяет с достаточной надежностью судить о «пусковых событиях», приводящих к регистрируемым в эксперименте биологическим реакциям (мутации, гибель клетки) и оценивать параметры мишени, ответственной за наблюдаемый радиобиологический эффект.

Наряду с успехами количественных исследований интересные результаты были получены в 1940-е гг. при анализе физико-химической природы процессов, происходящих в период между первичной абсорбцией энергии излучения и конечным биологическим эффектом. Было обнаружено зарождение в облучаемом растворе высокоактивных продуктов радиолиза воды – свободных радикалов, способных диффундировать на значительные расстояния и поражать биологические структуры.

Радиобиология начинает оперировать представлениями о «непрямом действии» излучения, опосредованном активными продуктами радиолиза воды. Были изучены физико-химические свойства первичных продуктов радиолиза воды и характер их взаимодействия с макромолекулами клетки. Эти исследования проводились в содружестве со специалистами в области радиационной химии. Полученные данные породили гипотезы о возможности ослабления лучевого поражения за счет введения в систему веществ – перехватчиков свободных радикалов, конкурирующих с биологическими структурами за продукты радиолиза воды.

Контрольные вопросы

1. Как можно сформулировать положения, лежащие в основе теории мишени?
2. В чем суть теории «точечного нагрева» и кто ее автор?
3. От чего зависит исход клеточной реакции при попадании в нее дискретных порций энергии?

4. Какие специфические черты действия ионизирующих излучений обнаруживаются при анализе зависимости эффекта от их дозы?
5. Как авторы теории мишени объясняли S-образную форму кривых выживания в линейных координатах?
6. В чем недостатки и достоинства теории мишени?

2.2. Гипотеза первичных радиотоксинов и цепных реакций

Значительный вклад в расшифровку биофизических механизмов лучевого поражения внесли работы Б.Н. Тарусова. Согласно выдвинутой им теории немногочисленные первичные повреждения инициируют цепные процессы окисления, в которые вовлекаются множественные субклеточные структуры. Такая теория физико-химического механизма усиления начального радиационного повреждения позволила объяснить многие радиобиологические феномены: развитие процессов лучевого поражения во времени, влияние температуры, газового состава атмосферы. Начинается поиск субстратов, в которых с наибольшей вероятностью могут протекать окислительные процессы, инициируемые облучением.

В середине 1950-х гг. Ю.Б. Кудряшов обнаружил, что высшие ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав клеточных липидов, обладают значительной уязвимостью к радиационному воздействию. Также было выявлено, что продукты перекисного окисления липидов во многом имитируют действие излучения на разнообразных биологических объектах и системах. Таким образом, автор показал радиомиметическое и радиосенсибилизирующее действия продуктов окисления высших ненасыщенных жирных кислот.

Эти и другие исследования позволили предположить, что в результате облучения происходит активное вовлечение липидов биомембран в процессы перекисного окисления, приводящее впоследствии к множественным поражениям и гибели клетки. Б.Н. Тарусов обосновал предположение о том, что в норме окислительные процессы в тканевых липидах протекают на низком уровне и находятся в стационарном режиме.

После облучения процессы окисления могут переходить в нестационарный режим и вовлекать различные компоненты внутриклеточных мембранных структур, обусловливая динамику лучевого поражения. Для развития этих представлений большое значение имели исследования механизмов окислительных реакций, проведенные Н.Н. Семеновым, Н.М. Эмануэлем и его школой. Далее значительное число работ, выполняемых под руководством Е.Б. Бурлаковой и ряда других

авторов, было посвящено выяснению механизмов окисления липидов, в первую очередь липидов, индуцированных ионизирующей радиацией.

Несмотря на стремление некоторых исследователей придать исключительное значение какому-то одному фактору, экспериментальные данные указывали на существование альтернативных путей реализации защитного эффекта даже для одного и того же радиопротектора.

В 1970-е гг. Ю.Б. Кудряшов и Е.Н. Гончаренко установили, что различные радиозащитные агенты к моменту своей максимальной эффективности снижают в тканях животных уровень продуктов перекисного окисления липидов (природных сенсибилизаторов лучевого поражения) и увеличивают содержание биогенных аминов, которые наряду с тиолами относятся к природным противолучевым веществам. На основании этих данных авторы предложили гипотезу «эндогенного фона радиорезистентности».

Эти исследования привели к накоплению обширного фактического материала по общей картине лучевого поражения и его модификации, позволили наметить пути к выяснению основных закономерностей зарождения «пусковых», «запальных» физико-химических процессов, механизмов ослабления или усиления первичных лучевых реакций.

В результате на первый план выдвинулись исследования, посвященные анализу физико-химических процессов, протекающих в клетке от момента возникновения начальных структурных повреждений до проявления выраженных биохимических и морфологических изменений. С этой целью анализируется модифицирующее действие кислорода, температуры и других агентов, влияющих на развитие лучевого поражения биологических объектов. Большое число работ посвящается проблеме миграции энергии и заряда в облученной системе, анализируется роль свободных радикалов, относительный вклад прямого и непрямого действия ионизирующей радиации.

В последующие годы значительных успехов добилась молекулярная радиобиология (прежде всего в расшифровке механизма лучевой инактивации ферментов и нуклеиновых кислот), использовавшая весь накопленный ею экспериментальный арсенал. При этом сформировалось новое направление в радиационной биологии, которое основывается на новых фундаментальных физических и квантово-механических принципах, опыте количественной радиобиологии, новейших открытиях молекулярной биологии о причинно-следственных отношениях между структурой и биологическими функциями макромолекул.

Феномен клеточного восстановления от радиационного поражения, описанный в 1960-е гг. благодаря развитию методов культивирования клеток, начинает приобретать объяснение на молекулярном уровне: был открыт и детально проанализирован механизм репарации радиационных повреждений ДНК. Это крупнейший вклад радиобиологии в науку о живом. Оказалось, что в клетках функционирует сложнейшая ферментативная система, поддерживающая структурную целостность генома. Эти ферменты способны распознавать и исправлять дефекты структуры ДНК, возникающие вследствие радиационного воздействия. Функционирование репаративных систем зависит от состояния внутриклеточного метаболизма, интенсивности энергетических процессов. Становится понятным молекулярный механизм известных радиобиологических эффектов, таких как зависимость лучевого поражения от условий пострадиационного культивирования клеток, состояния метаболических систем и других физиологических факторов. Для современной радиационной биологии становится общепринятым рассмотрение конечного радиобиологического эффекта как результата интерференции двух противоположно направленных процессов: реализации первичного поражения и его восстановления репаративными системами. Все большее распространение получает структурно-метаболическая теория лучевого поражения, развиваемая А.М. Кузиным.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается суть теории, выдвинутой Б.Н. Тарусовым?
2. Какое явление обнаружил в середине 1950-х гг. Ю.Б. Кудряшов?
3. Какие исследования привели к накоплению обширного фактического материала по общей картине лучевого поражения и его модификации?
4. Для развития каких представлений большое значение имели исследования, проведенные Н.Н. Семеновым, Н.М. Эмануэлем, Е.Б. Бурлаковой?
5. На основании каких данных и кем была предложена гипотеза «эндогенного фона радиорезистентности»?
6. В чем заключается крупнейший вклад радиобиологии в науку о живом?

2.3. Структурно-метаболическая теория

В основе теории, активно разрабатываемой А.М. Кузиным с 1965 г., лежит идея о том, что под действием ионизирующего излучения в клетке не только возникают чисто радиационно-химические повреждения, но благодаря биохимическим механизмам усиления в организме синтезируются высокореакционные продукты, приводящие к дополнительному повреждению биологически важных макромолекул и образованию низкомолекулярных токсических метаболитов.

В рассматриваемой теории решающее значение отводится не только радиационному поражению ядерных макромолекул, но и нарушениям цитоплазматических структур и их нормального функционирования, осуществляемого благодаря присущей им упорядоченности.

Повреждения такой строго скоординированной системы в одном или нескольких звеньях приводят к нарушениям мембран и сопряжения важных метаболических процессов: инактивации ферментов, расстройству управляющих систем и другим тяжелым последствиям.

В монографии «Структурно-метаболическая теория в радиобиологии» (1986) А.М. Кузьминым сделана попытка анализа многочисленных фактов, накопленных радиобиологией за текущие десятилетия. Автор приходит к заключению, что данная теория является общей теорией действия радиации на биологические объекты, начиная с клеточного уровня и заканчивая высокоорганизованными многоклеточными организмами.

В то же время данная теория не может быть признана универсальной, так как в ней не определены количественные соотношения между накоплением первичных радиотоксинов (ПРТ) в клетке и степенью ее поражения.

Контрольные вопросы

1. В каком году и кем была предложена структурно-метаболическая теория?
2. Каким процессам отводится решающее значение при радиационном поражении согласно структурно-метаболической теории?
3. В каком научном труде сделана попытка анализа многочисленных фактов, накопленных радиобиологией за текущие десятилетия?
4. Почему структурно-метаболическая теория не может быть признана универсальной?

2.4. Стохастическая теория

Во второй половине XX в. появляются интересные исследования, посвященные формально-статистическому анализу радиобиологических процессов. Эти работы основываются на достижениях количественной радиационной биологии и представлениях о динамическом характере формирования лучевого поражения. На смену классическим представлениям о наличии статичной мишени, попадание в которую однозначно приводит к тестируемому биологическому эффекту облучения, приходят динамические модели, учитывающие вероятность реализации повреждений и их восстановления за счет протекания репаративных процессов. Такова стохастическая гипотеза О. Хуга и А. Келлерера и вероятностная модель Ю.Г. Капульцевича.

Так, стохастическая теория рассматривает различные возмущения биологической системы, возникающие в процессе жизнедеятельности или под влиянием облучения, с позиций теории вероятностей, стремясь описать их моделями, максимально соответствующими представлениям динамической биохимии и молекулярной радиобиологии. В этом случае мишенями являются все компоненты живой системы, а регистрируемая реакция обусловлена суперпозицией самых разных событий. В 1966 г. была издана монография А. Хуга, А. Келлерера «Стохастическая радиобиология», которая была переведена на русский язык в 1969 г.

Существенно, что стохастическая гипотеза учитывает как физиологические, так и индуцированные излучением процессы в их динамике, в то время как классическая теория мишени рассматривает эффекты, вызванные облучением, как строго детерминированные первичными актами абсорбции энергии. Посредством математического аппарата (с помощью систем дифференциальных уравнений) в стохастической теории учитывается количественное влияние любого модифицирующего фактора на соответствующие дозовые зависимости.

Итак, в соответствии с основными исходными позициями стохастическая концепция предлагает как бы более «биологическую» интерпретацию кривых доза – эффект по сравнению с их объяснением с позиций теории мишени. Но при этом остались два незыблемых определяющих фактора классической теории мишеней – *дискретность радиационного агента* и *функциональная негомогенность биологического объекта*. Стохастическая гипотеза приводит к пониманию того, что экспоненциальная кривая указывает на систему без компенсаторных механизмов, а сигмоидальная – соответствует системам, обладающим такими механизмами, эффективность которых снижается при возрастании дозы.

Основная особенность данной теории – строго количественный подход, однако математический аппарат этой теории достаточно сложен, что затрудняет ее широкое применение.

Контрольные вопросы

1. На чем основывались исследования в области радиобиологии, появившиеся во второй половине XX в.?
2. С каких позиций стохастическая теория рассматривает различные возмущения биологической системы? Кто ее авторы?
3. Какие определяющие факторы классической теории мишеней остались в стохастической теории?
4. Какова основная особенность стохастической гипотезы? В чем заключается недостаток этой теории?

2.5. Вероятностная модель радиационного поражения клетки

Изучая вегетативное размножение облученных клеток (дрожжей), Ю.Г. Капульцевич в 1978 г. предложил вероятностную модель радиационного поражения клетки.

Согласно этой модели разные клетки, подвергнутые облучению в одной и той же дозе, поражаются в разной степени в соответствии с принципом попадания. Однако в отличие от классических представлений и потенциальные, и реализованные повреждения проявляются с вероятностью меньше единицы. Реализованные повреждения (или индуцированные ими изменения) наследуются при делении клетки с некоторой вероятностью, зависящей от числа этих повреждений, и приводят к неосуществлению клеточного деления. При этом вероятность проявления повреждения может зависеть как от биологических (генетических) особенностей клеток, так и от условий их культивирования.

Главное отличие вероятностной модели от классических состоит в том, что, согласно последним, радиочувствительность клетки определяется лишь объемом мишени и критическим числом попаданий. С позиций же вероятностной модели проблема радиочувствительности представляется более сложной. Процесс радиационного поражения клетки Ю.Г. Капульцевич формально делит на три этапа:

- 1-й этап – осуществление событий попадания, в результате которых формируются первичные потенциальные повреждения;
- 2-й этап – реализация потенциальных повреждений;
- 3-й этап – различные вторичные нарушения нормального протекания внутриклеточных процессов, вызываемые реализацией повреждений. По-видимому, на этом этапе возможно восстановление клеток от последствий реализованных повреждений или их компенсация, поэтому вероятность проявления реализованного повреждения не равна единице. Она зависит от биологических особенностей клетки и от условий культивирования.

Однако ни сама модель, ни производимый с ее помощью анализ реакций клеток на облучение не позволяют выявить природу повреждений, лежащих в основе данных реакций. Кроме того, сделанные выводы были получены при исследовании дрожжевых клеток, что затрудняет их проверку применимости к описанию лучевых реакций клеток млекопитающих.

Разработанные в вышеуказанных исследованиях математические построения позволяют на основании экспериментальных кривых доза – эффект получать количественную информацию о характере пусковых событий лучевого поражения и особенностях их реализации в клетках.

В последние годы во многих радиационно-биофизических исследованиях рассматривается вопрос о степени специфичности ответной реакции биологических систем на радиационное воздействие.

Еще в 1960-е гг. В.П. Парибок высказал предположение, согласно которому известная способность репаративных систем устранять радиационные повреждения ДНК – это лишь одно из проявлений неспецифической реакции живой системы на повреждающее воздействие. Иначе говоря, предполагается, что в клетках существуют системы, поддерживающие нативное состояние ее структур и реагирующие на любое повреждающее воздействие. В исследованиях Л.Х. Эйдуса был проведен анализ механизмов неспецифической реакции клеток на повреждающие воздействия, к которым автор наряду с ионизирующей радиацией относил и действие различных радиопротекторов.

Согласно развиваемой им гипотезе под влиянием повреждающего агента возникают однотипные изменения, включающие нарушение мембранного транспорта и соответствующих градиентов концентрации низкомолекулярных соединений, которые локально накапливаются в компартментах клеток, сорбируются на макромолекулах и изменяют их конформационную подвижность. В итоге может наступить состояние паранекроза, обратимое при умеренно повреждающих воздействиях. При этом изменяется соотношение скоростей конкурирующих между собой процессов реализации и репарации «скрытых повреждений» в уникальных структурах, ответственных за гибель клеток.

Представления о молекулярных механизмах неспецифической реакции клеток на повреждающие воздействия, безусловно, нуждаются в дальнейшей конкретизации. Однако сама постановка вопроса о неспецифичности рассматриваемых процессов и систем позволяет рассматривать известные радиобиологические феномены как одно из проявлений общебиологической реакции живых систем на любые повреждающие воздействия. Это означает, что методологические подходы, математический аппарат и методические приемы, накопленные радиационной биологией, приобретают важное значение для современной биологии в целом.

В настоящее время намечается объединение крайних полюсов ценнейшей информации в теоретической радиобиологии. Очевидно, в этом – ближайшее будущее радиационной биологии. Можно ожидать, что синтез физико-химических, молекулярных и традиционных биологических (радиобиологических) подходов позволит вскоре ответить на ключевой вопрос радиационных исследований: «Каков механизм первичных пусковых процессов лучевого поражения и как более эффективно управлять им?»

Контрольные вопросы

1. В каком году и кем была предложена вероятностная модель радиационного поражения клетки?
2. В чем заключается отличие вероятностной модели от классических представлений о радиочувствительности клетки?
3. На какие этапы, согласно вероятностной модели, делится процесс радиационного поражения клетки?
4. Каковы недостатки вероятностной модели радиационного поражения клетки?
5. Какое предположение в 1960-е гг. высказал исследователь В.П. Парибок?
6. В чем заключается суть исследований Л.Х. Эйдуса?
7. Какие тенденции в теоретической радиобиологии происходят на современном этапе?

Глава 3

ПОВРЕЖДЕНИЕ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

3.1. Хромосомные аберрации и их классификация

Хромосомные аберрации (хромосомные перестройки, хромосомные мутации) – тип мутаций, которые изменяют структуру хромосом. Изменение структуры хромосом связано с ее разрывом, последующим перераспределением, утратой или частичным удвоением генетического материала.

Хромосомные мутации характеризуются изменениями положения участков, размеров и организацией хромосом. В такие перестройки могут быть вовлечены участки одной хромосомы или разных, негомологичных. Хромосомные перестройки возникают в результате образовавшихся при мутагенном воздействии разрывов хромосом, последующей утраты некоторых фрагментов и воссоединения частей хромосомы в ином порядке по сравнению с нормальной хромосомой.

Выделяют следующие виды хромосомных перестроек: *делеции, инверсии, дупликации, транслокации*, а также *дицентрические* и *кольцевые хромосомы*, *изохромосомы*.

Если перестройка изменяет структуру одной хромосомы, то такую перестройку называют *внутрихромосомной перестройкой* (инверсии, делеции, дупликации, кольцевые хромосомы), если же двух разных хромосом, то такую перестройку называют *межхромосомной перестройкой* (транслокации, дицентрические хромосомы).

Хромосомные перестройки подразделяют также на *сбалансированные* и *несбалансированные*. Сбалансированные перестройки (инверсии, реципрокные транслокации) не приводят к потере или добавлению генетического материала при формировании, поэтому их носители, как правило, фенотипически нормальны. Несбалансированные перестройки (делеции и дупликации) меняют дозовое соотношение генов, и, как правило, их носительство сопряжено с существенными отклонениями от нормы.

Хромосомные перестройки играют важную роль в эволюционном процессе и видообразовании, в нарушении фертильности, в развитии онкологических и врожденных наследственных заболеваний человека.

Основной предпосылкой для возникновения хромосомных перестроек является появление в клетке разрывов обеих нитей спирали ДНК в пределах нескольких пар оснований. Двунитевые разрывы ДНК могут

возникать в клетке спонтанно или под действием различных мутагенных факторов: физической (ионизирующее излучение), химической или биологической (транспозоны, вирусы) природы. Двунитевые разрывы ДНК возникают запрограммированно во время профазы I мейоза, а также при созревании Т- и В-лимфоцитов во время специфической соматической V(D)J рекомбинации. Нарушения и ошибки процесса восстановления двунитевых разрывов ДНК приводят к появлению хромосомных перестроек.

Делеция – это утрата участка хромосомы. Различают *терминальные* и *интеркалярные* делеции. Терминальные делеции связаны с утратой концевого участка хромосомы, а интеркалярные – с утратой на внутреннем участке хромосомы (рис. 3.1).

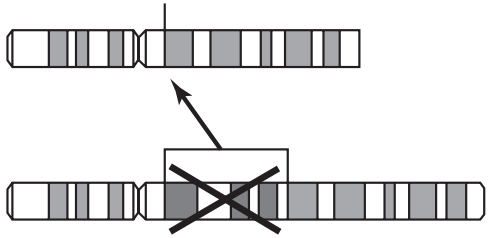

Рис. 3.1. Интеркалярная делеция

Если после образования делеции хромосома сохранила центромеру, она аналогично другим хромосомам передается при митозе, участки же без центромеры, как правило, утрачиваются. При конъюгации гомологичных хромосом во время мейоза у нормальной хромосомы на месте, соответствующем интеркалярной делеции у дефектной хромосомы, образуется делеционная петля, которая компенсирует отсутствие делетированного участка.

Врожденные делеции у человека редко захватывают протяженные участки хромосом, обычно такие аберрации приводят к гибели эмбриона на ранних этапах развития. Самым хорошо изученным заболеванием, обусловленным достаточно крупной делецией, является синдром кошачьего крика, описанный в 1963 г. Жеромом Леженом. В его основе лежит делеция участка короткого плеча пятой хромосомы. Для больных характерен ряд отклонений от нормы: нарушение функций сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, недоразвитие гортани с характерным криком, напоминающим кошачье мяуканье, общее отставание развития, умственная отсталость, лунообразное лицо с широко расставленными глазами. Синдром встречается у одного новорожденного из 50 000.

Современные методы выявления хромосомных нарушений, прежде всего флуоресцентная гибридизация *in situ*, позволили установить связь между микроделециями хромосом и рядом врожденных синдромов. Микроделециями, в частности, обусловлены давно известные синдром Прадера – Вилли и синдром Вильямса.

Дупликация – это повторение участка хромосомы. Дупликации представляют собой класс перестроек, который объединяет как внутри- , так и межхромосомные перестройки. Вообще любая дупликация – это появление дополнительной копии участка хромосомы, которая может располагаться сразу за тем районом, который дуплицирован, тогда это *тандемная дупликация* (рис. 3.2), либо в новом месте или в другой хромосоме. Новая копия может образовать отдельную маленькую хромосому со своими собственными теломерами и центромерой, тогда это *свободная дупликация*.

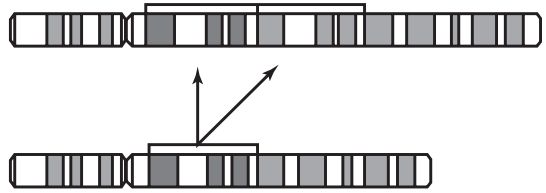

Рис. 3.2. Тандемная дупликация

Тандемные дупликации появляются в половых клетках при мейозе в результате неравного кроссинговера (в этом случае второй гомолог несет делецию) или в соматических клетках в результате неаллельной гомологичной рекомбинации при репарации двунитевого разрыва ДНК. В процессе кроссинговера у гетерозиготы при конъюгации хромосомы с тандемной дупликацией и нормальной хромосомы, как и при делеции, формируется компенсационная петля.

Практически у всех организмов в норме наблюдается множественность генов, кодирующих рРНК (рибосомальную РНК). Это явление называют избыточностью генов. Так, у E. coli на рДНК (ДНК, кодирующее рРНК) приходится 0,4% всего генома, что соответствует 5–10 копиям рибосомальных генов.

Другой пример дупликации – мутация Bar у Drosophila, обнаруженная в 1920-х гг. Т. Морганом и А. Стертевантом. Мутация обусловлена дупликацией локуса 57.0 Х-хромосомы. У нормальных самок (B^+/B^+) глаз имеет 800 фасеток, у гетерозиготных самок (B^+/B) – 350 фасеток, у гомозигот по мутации (B/B) – всего 70 фасеток. Обнаружены также самки с трижды повторенным геном – double Bar (B^D/B^+).

В 1970 г. Сусумо Оно в монографии «Эволюция путем дупликации генов» разработал гипотезу об эволюционной роли дупликаций, поставляющих новые гены, не затрагивая при этом функций исходных генов. В пользу этой идеи говорит близость ряда генов по нуклеотидному составу, но кодирующих разные продукты. Это трипсин и химотрипсин, гемоглобин и миоглобин и ряд других белков.

Инверсия – изменение порядка генов участка хромосомы на обратный, т.е. поворот участка хромосомы на 180°. Различают *парацентрические* и *перицентрические* инверсии (рис. 3.3, 3.4). При парацентрических инверсиях инвертированный фрагмент лежит по одну сторону от центромеры, а при перицентрических инверсиях инвертированный фрагмент лежит по разные стороны от центромеры.

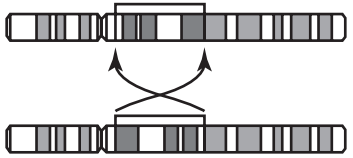

Рис. 3.3. Парацентрическая инверсия

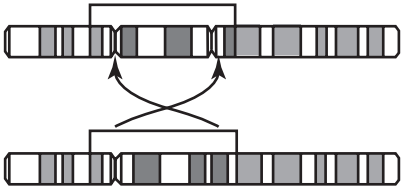

Рис. 3.4. Перицентрическая инверсия

При инверсиях не происходит потери генетического материала, поэтому инверсии, как правило, не влияют на фенотип носителя. Однако если у гетерозигот по инверсиям (т.е. у организма, несущего как нормальную хромосому, так и хромосому с инверсией) в процессе гаметогенеза при мейозе происходит кроссинговер в пределах инвертированного участка, то существует вероятность формирования аномальных хромосом, что в свою очередь может привести к частичной элиминации половых клеток, а также формированию гамет с несбалансированным генетическим материалом.

Более 1% человеческой популяции является носителями перицентрической инверсии в хромосоме 9, которую считают вариантом нормы.

Транслокация – межхромосомная перестройка, при которой происходит перенос участка одной хромосомы на другую. Отдельно выделяют *реципрокные транслокации* и *робертсоновские транслокации*, или центрические слияния. При реципрокных транслокациях две негомологичные хромосомы обмениваются участками (рис. 3.5), а при робертсоновских транслокациях две негомологичные акроцентрические хромосомы объединяются в одну с утратой материала коротких плеч.

Первым центрические слияния описал У. Робертсон в 1916 г., сравнивая кариотипы близких видов саранчовых.

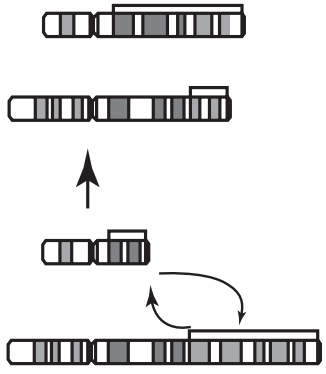

Рис. 3.5. Реципрокная транслокация

Реципрокные транслокации не сопровождаются утратой генетического материала, их также называют *сбалансированными транслокациями*, они, как правило, не проявляются фенотипически. Однако у носителей реципрокных транслокаций половина гамет несет несбалансированный генетический материал, что приводит к снижению фертильности, повышенной вероятности спонтанных выкидышей и рождения детей с врожденными аномалиями.

Частота гетерозигот по реципрокным транслокациям оценивается как 1 на 600 супружеских пар. Реальный риск рождения детей с несбалансированным кариотипом определяется характером реципрокной транслокации (спецификой хромосом, вовлеченных в перестройку, размерами транслоцированных сегментов) и может достигать 40%.

Примером реципрокной транслокации может служить транслокация типа «филадельфийская хромосома» (Ph) между хромосомами 9 и 22. В 95% случаев именно эта мутация в гемопоэтических клетках-предшественниках является причиной хронического миелобластного лейкоза. Эту перестройку описали П. Новелл и Д. Хангерфорд в 1960 г. и назвали в честь города в США, где оба работали. В результате этой транслокации ген ABL1 из хромосомы 9 объединяется с геном BCR хромосомы 22. Активность нового химерного белка приводит к нечувствительности клетки к воздействию факторов роста и вызывает ее безудержное деление.

Робертсоновские транслокации являются одним из наиболее распространенных типов врожденных хромосомных аномалий у человека. По некоторым данным, их частота составляет 1 : 1000 новорожденных. Их носители фенотипически нормальны, однако у них существует риск самопроизвольных выкидышей и рождения детей с несбалансированным кариотипом, который существенно варьирует в зависимости от хромосом, вовлеченных в слияние, а также от пола носителя.

Большинство робертсоновских транслокаций (74%) затрагивает хромосомы 13 и 14. В структуре обращаемости на пренатальную диагностику лидерами оказываются носители der(13; 14) и der(14; 21). Последний случай, а именно робертсоновская транслокация с участием хромосомы 21, приводит к наследуемому синдрому Дауна.

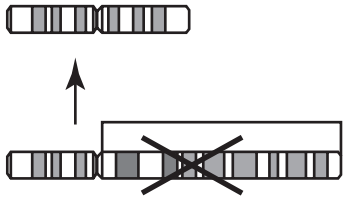

Рис. 3.6. Изохромосома

Робертсоновские транслокации, возможно, являются причиной различий между числом хромосом у близкородственных видов. Показано, что различные виды дрозофил имеют от трех до шести хромосом.

Робертсоновские транслокации привели к появлению в Европе нескольких видов-двойников (хромосомные расы) у мышей группы видов Mus musculus, которые, как правило, географически изолированы друг от друга. Набор и, как правило, экспрессия генов при робертсоновских транслокациях не изменяются, поэтому виды практически не отличимы внешне. Однако они имеют разные кариотипы, а плодовитость при межвидовых скрещиваниях резко понижена.

Изохромосомы состоят из двух копий одного плеча хромосомы, соединенных центромерой таким образом, что плечи образовавшейся хромосомы представляют собой зеркальные отражения друг друга (рис. 3.6). В определенном смысле изохромосома представляет собой гигантскую инвертированную дупликацию размером с целое плечо и делецию другого плеча.

Пациенты с 46 хромосомами, из которых одна представляет собой изохромосому, являются моносомиками по генам утраченного хромосомного плеча и трисомиками по генам, присутствующим в изохромосоме. Если изохромосома добавочная, то данный пациент является тетрасомиком по генам, представленным в изохромосоме.

В целом чем меньше изохромосома, тем меньше генетический дисбаланс и тем более вероятно выживание плода или ребенка с такой перестройкой. Следовательно, неудивительно, что наиболее частые из описанных случаев аутосомных изохромосом вовлекают хромосомы с маленькими плечами. Некоторые из наиболее частых участников формирования изохромосом – это короткие плечи хромосом 5, 8, 12, 18.

Для объяснения возникновения изохромосом можно предположить два механизма:

- вследствие аномального поперечного разделения центромеры при делении клетки;
- в результате неправильного слияния концов изохроматидного разрыва, образовавшегося в прицентромерной области.

В первом случае происходит неправильное разделение центромеры в мейозе II. Во втором случае происходит транслокация, включающая целое плечо гомологичной хромосомы (или сестринской хроматиды) в области, непосредственно примыкающей к центромере. Формально последние изохромосомы можно назвать изодицентрическими, поскольку у них две центромеры, хотя они обычно цитогенетически не различимы, поскольку находятся очень близко друг к другу. Наиболее часто встречающаяся изохромосома – изохромосома длинного плеча Х-хромосомы – i(Xq) – у некоторых пациенток с синдромом Тернера.

Описаны изохромосомы для множества аутосом, включая изохромосомы короткого плеча хромосомы 8 – i(18p) и короткого плеча хромосомы 2 – i(12p).

Изохромосомы также часто выявляют в кариотипах доброкачественных и злокачественных новообразований.

Контрольные вопросы

1. Какие процессы происходят при хромосомных аберрациях? Чем они вызваны?
2. Какие выделяют виды хромосомных перестроек?
3. Какова основная предпосылка возникновения хромосомных перестроек?
4. Какие мутации в хромосомах происходят при делеции? Каковы последствия этой мутации для человека?
5. Что представляют собой дупликации? Где они происходят?
6. Какова возможная роль дупликации в эволюции? Какие примеры дупликации вы можете привести?
7. Какие различают инверсии? Что происходит при этих процессах?
8. Как можно охарактеризовать процесс транслокации? Какие примеры данной хромосомной мутации вы можете привести?
9. Из каких компонентов состоят изохромосомы?
10. Каковы возможные механизмы возникновения изохромосом?
11. Какая изохромосома наиболее часто встречается? Причиной какого заболевания она является?

3.2. Классификация радиоиндуцированных хромосомных аберраций

Мутагенные воздействия, вызывающие двунитевые разрывы ДНК, приводят к появлению хромосомных перестроек в клетках. Самым хорошо охарактеризованным мутагеном, индуцирующим хромосомные аберрации, является ионизирующее излучение. Родоначальником радиационной цитогенетики считается Карл Сакс, чья фундаментальная работа «Chromosome Aberrations Induced by X-Rays» была опубликована в 1938 г.

Для классификации радиоиндуцированных хромосомных нарушений создана собственная классификация аберраций, которая лишь частично совпадает с классификацией, используемой в медицинской

генетике. В этой классификации выделяют *аберрации хромосомного* и *хроматидного* типа, которые в свою очередь могут быть *обменными* и *простыми*, *стабильными* и *нестабильными*.

Тип хромосомных аберраций в значительной степени обусловлен фазой клеточного цикла, на котором находилась клетка в момент облучения.

При облучении клеток на стадии $G_0 - G_1$ клеточного цикла наблюдают аберрации хромосомного типа. Наиболее характерными среди них являются так называемые обменные хромосомные аберрации, а именно дицентрические и кольцевые хромосомы, образующиеся в результате неправильного воссоединения двунитевых разрывов ДНК. Дицентрические и кольцевые хромосомы, как правило, сопровождаются фрагментом хромосомы, не содержащим центромеры, так называемым хромосомным ацентрическим фрагментом.

К обменным аберрациям хромосомного типа относятся и транслокации. Нерепарированные двунитевые разрывы ДНК приводят к делециям хромосом и формированию ацентрических хромосомных фрагментов, которые можно наблюдать в ближайшем митозе. Дицентрики, кольца и ацентрические фрагменты плохо передаются в череде клеточных делений и в делящихся клетках со временем исчезают, поэтому их относят к нестабильным хромосомным перестройкам. Транслокации, не приводящие к потере генетического материала, беспрепятственно передаются дочерним клеткам в митозе, поэтому их классифицируют как стабильные аберрации.

Дицентрические хромосомы (***дицентрики***) – редкий тип аномальной хромосомы с потерей ацентрических фрагментов, когда два хромосомных сегмента из разных хромосом или из двух хроматид одной хромосомы (каждый с центромерой) соединяются конец в конец.

Дицентрические хромосомы, несмотря на две центромеры, могут быть стабильными, если одна из двух центромер инактивирована или если центромеры в анафазе координируют свое перемещение к одному и тому же полюсу. Такие хромосомы формально называют псевдодицентрическими. Наиболее часто псевдодицентрики состоят из половых или акроцентрических хромосом (робертсоновские транслокации).

Кольцевая хромосома – замкнутая двухцепочечная молекула ДНК, естественная структура хромосом у многих прокариот, некоторых вирусов, а также молекул ДНК, входящих в состав пластид и митохондрий эукариот. У некоторых вирусов кольцевая хромосома состоит из одноцепочечной молекулы ДНК или РНК.

Кольцевые хромосомы могут также быть результатом структурной хромосомной аберрации, появляющейся в результате мутаций. Мелкие кольцевые хромосомы могут образовываться при фрагментациях хромосом.

Если облучение вызвало появление двунитевого разрыва ДНК в участке хромосомы, уже прошедшем удвоение в процессе репликации в S-фазе клеточного цикла, то это может привести к образованию аберраций хроматидного типа. Наиболее типичными аберрациями хроматидного типа являются тетрарадиалы (обменные аберрации, возникающие в процессе неправильного соединения двух двунитевых разрывов ДНК, находящихся на хроматидах разных хромосом) и хроматидные фрагменты (нерепарированный двунитевый разрыв ДНК).

Дицентрики и кольца, а также некоторые обменные аберрации хроматидного типа часто приводят к формированию мостов в анафазе митоза, которые можно детектировать с помощью ана-телофазного метода анализа хромосомных аберраций.

Контрольные вопросы

1. Почему ионизирующее излучение является хорошо охарактеризованным мутагеном, индуцирующим хромосомные аберрации?
2. Какие хромосомные аберрации выделяют в классификации радиоиндуцированных нарушений?
3. Какие хромосомные аберрации наблюдаются при облучении клеток на стадии $G_0 - G_1$ клеточного цикла?
4. Как можно охарактеризовать механизм образования дицентрических хромосом?
5. В результате какого процесса образуются кольцевые хромосомы?
6. Какие процессы приводят к аберрациям хроматидного типа?
7. Какие нарушения можно детектировать с помощью ана-телофазного метода анализа хромосомных аберраций?

3.3. Радиационно-индуцированные генные мутации

Полагают, что в других случаях вызванные ионизацией менее крупные внутримолекулярные перестройки влекут за собой подлинные генные мутации, т.е. такие внутримолекулярные перестройки групп атомов, которые не вызывают изменений структуры хромосомы. Недавно было также выяснено, что связь между облучением и мутационным процессом, возможно, носит не столь прямой характер, как это представлялось ранее. Энергия излучения поглощается, по-видимому, не только в хромосомах, но и в окружающей их среде, что может вызвать химические изменения, которые в свою очередь вызывают генные мутации или фрагментацию хромосом.

Генные (точковые) мутации – это изменения числа и (или) последовательности нуклеотидов в структуре ДНК (вставки, выпадения, перемещения, замещения нуклеотидов) в пределах отдельных генов, приводящие к изменению количества или качества соответствующих белковых продуктов. Замены оснований приводят к появлению трех типов мутантных кодонов:

- с измененным смыслом (миссенс-мутации);
- с неизмененным смыслом (нейтральные мутации);
- бессмысленные (нонсенс-мутации).

В результате миссенс-мутации в кодируемом данным геном полипептиде одна аминокислота замещается на другую, поэтому фенотипическое проявление мутации зависит от функциональной значимости затронутого домена. Так замены аминокислот в активных центрах белков могут сопровождаться полной потерей их функциональной активности. К примеру, миссенс-мутация в 553-м кодоне гена FAC, приводящая к замене лейцина на пролин, делает продукт этого гена не способным комплементировать функциональный дефект в клетках больных анемией Фанкони.

Не всякая замена аминокислоты отразится на функциональной активности белка, вследствие чего прозошедшая мутация может остаться не выявленной. Этим объясняется факт отмечаемого несовпадения частоты мутаций в определенном гене и встречаемости мутантов по нему. Кроме того, в силу вырожденности генетического кода не всякая замена основания приведет к миссенс-мутации. Возможно, она окажется нейтральной.

Замены нуклеотидов в кодирующих областях генов, не сопровождающиеся заменами аминокислот в силу вырожденности генетического кода, приводят к нейтральным мутациям, не оказывающим заметного влияния ни на функцию соответствующего белка, ни на его структуру.

В результате нонсенс-мутации кодон, определяющий какую-либо аминокислоту, превращается в один из стоп-кодонов, не транслирующихся на рибосомах (UAA UAG, UGA). Появление такого кодона не в конце структурного гена, а внутри него приводит к преждевременной терминации трансляции и обрыву полипептидной цепи. Нонсенс-мутации обладают наибольшим повреждающим действием, так как образующиеся при преждевременной терминации трансляции белки не способны к модификации, часто не защищены от действия протеолитических ферментов и быстро деградируют.

Вставки, перемещения или выпадения отдельных оснований или их коротких последовательностей в пределах гена вызывают сдвиг рамки считывания. Природа таких мутаций была изучена при анализе аминокислотной последовательности белков фага Т4, кодируемых геном дикого типа e^+ и тремя разными мутантными генами, сдвигающими рамку считывания.

Оказалось, что некоторые единичные мутации являются следствием одновременных изменений нескольких соседних нуклеотидов. Скорее всего, единичная мутация со сдвигом рамки возникает в результате вставки двух соседних нуклеотидов, а не одного. При возникновении мутаций со сдвигом рамки считывания меняются все триплеты ниже сайта дупликации или делеции по ходу считывания, при этом повышается вероятность возникновения стоп-кодонов и соответственно терминации трансляции.

С точки зрения структурно-функциональной организации генов происходящие внутри них замены, вставки, выпадения, перемещения нуклеотидов можно объединить в следующие группы:

- мутации в регуляторных областях генов, вызывающие в 5′- и 3′-нетранслируемых областях генов количественные изменения соответствующих продуктов и проявляющиеся фенотипически (клинически) в зависимости от порогового уровня белков, при котором их функция еще сохраняется:

– мутации в промоторной части (например, регуляторном элементе с последовательностью PuCPuCCC и внутри TATA-бокса у гена р-глобина) – снижают уровень синтеза белкового продукта;

– мутации в сайте полиаденилирования – снижают уровень транскрипции (характерны для афроамериканцев, страдающих талассемией);

- мутации в кодирующих областях генов:

– мутации в экзонах – могут приводить к преждевременному окончанию белкового синтеза (к примеру, в случае талассемии, когда в результате мутаций внутри экзона гена гемоглобина белковая цепь оказывается укороченной и не обладает активностью);

– мутации в интронах – способны генерировать новые сайты сплайсинга и, конкурируя с нормальными (исходными), в итоге заменяют их (например, возникновение замен в гене гемоглобина, замедляющих сплайсинг, известно и для B^0-, и для β^+-талассемии);

– мутации в сайтах сплайсинга (на стыках экзонов и нитронов) – нарушают процессинг первичного РНК-транскрипта и приводят к трансляции бессмысленных белков (например, удлиненного при неправильном вырезании интронов либо укороченного при вырезании экзонов).

Контрольные вопросы

1. Какие изменения происходят в клетке в результате вызванных радиацией генных (точковых) мутаций?

2. Какие типы мутантных кодонов, возникающих в результате замены оснований в структуре ДНК, можно перечислить?

3. Какой пример миссенс-мутации вы можете привести?

4. В чем заключаются особенности нейтральных мутаций?

5. Почему нонсенс-мутации обладают наибольшим повреждающим действием?

6. В какие группы объединяются мутации с точки зрения структурно-функциональной организации генов?

3.4. Методы детекции хромосомных перестроек

Хромосомные перестройки впервые были обнаружены у дрозофил с помощью генетического анализа. В некоторых скрещиваниях соотношение числа потомков в разных классах сильно отличалось от ожидаемого, и это объяснили наличием перестроек в хромосомах родителей.

Делеции, дупликации и транслокации обнаружил К. Бриджес в 1916, 1919 и 1923 гг. соответственно. Первую инверсию описал А. Стертевант в 1921 г., сравнивая порядок генов в хромосоме 3 у D. melanogaster и D. simulans.

Первые цитологические наблюдения хромосомных перестроек были сделаны на политенных хромосомах слюнных желез дрозофилы. Лишь спустя некоторое время хромосомные перестройки были показаны на митотических хромосомах.

Цитологически хромосомные перестройки могут быть выявлены также в профазе первого деления мейоза на стадии пахитены благодаря синапсису гомологичных участков хромосом. Подобный анализ был впервые проведен Барбарой Мак-Клинток в 1930 г. при изучении транслокации у кукурузы.

В медицинской генетике хромосомные перестройки выявляют и анализируют с помощью цитогенетических методов. Наиболее часто анализ хромосомных перестроек проводят цитологически на стадии метафазы. Самым распространенным и доступным цитогенетическим методом является метод дифференциальной G-окраски хромосом (G-бэндинг).

С конца 1980-х гг. для выявления хромосомных перестроек применяют метод флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием ДНК-проб к отдельным хромосомам или хромосомным локусам.

Одним из наиболее точных методов обнаружения небольших дупликаций и делеций в настоящее время является метод сравнительной геномной гибридизации на препаратах метафазных хромосом или ДНК-микрочипах.

Дупликации и делеции также могут быть выявлены и при полногеномном SNP-генотипировании. Следует отметить, что два последних метода не позволяют выявлять сбалансированные хромосомные перестройки и в отличие от других цитогенетических методов не позволяют проводить анализ хромосомных аберраций на уровне отдельной клетки, т.е. являются не чувствительными для случаев мозаицизма.

Контрольные вопросы

1. Какие хромосомные перестройки обнаружил К. Бриджес? Когда это произошло?

2. На каких объектах и какими методами обнаруживаются хромосомные перестройки?

3. Какой современный метод обнаружения небольших дупликаций, который является одним из наиболее точных, вы можете назвать?

4. Какие методы не позволяют выявлять сбалансированные хромосомные перестройки?

3.5. Репарация ДНК

Первые эксперименты по мутагенному действию ионизирующего излучения ставились на низших грибах и были выполнены Г.Н. Надсоном и Г.Ф. Филипповым в 1930-х гг. Затем последовала серия работ, в которых проверялся биологический эффект ионизирующего излучения на других экспериментальных объектах, в качестве которых были использованы дрозофила (Г. Мюллер, 1927), кукуруза и ячмень (Л. Стадлер, 1928).

К середине 1960-х гг. универсальность мутагенного действия ионизирующего излучения была доказана для большого числа видов, принадлежащих к любому из биологических царств.

С физико-химической точки зрения, для того чтобы возникла мутация, необходима последовательная реализация следующих этапов:

• 1-й этап – непосредственное взаимодействие энергии ионизирующего излучения с веществом клетки (событие, связанное с высвобождением энергии ионизирующего излучения в пределах клетки). На этом этапе происходит ионизации молекул, образование свободных электронов и нестабильных ионов. В случае реализации события в непосредственной близости от ДНК (в ядре) это событие прямо влияет на ее структуру;

• 2-й этап – происходит рекомбинация ионов, которая приводит к формированию электронно-возбужденных молекул. Эти молекулы в дальнейшем разлагаются на свободные радикалы в силу нестабильности своего состояния (непрямое действие).

Контрольные вопросы

1. На каких объектах проводились эксперименты по изучению мутагенного действия ионизирующего излучения?
2. Какие ученые проводили исследования по изучению мутагенного действия ионизирующего излучения и в какие годы?
3. Реализация каких этапов необходима для возникновения мутаций с физико-химической точки зрения?

3.5.1. Радиационно-индуцированное повреждение ДНК

Радиационно-индуцированное повреждение ДНК может быть прямым или непрямым. Прямое повреждение приводит к возникновению положительно-заряженного радикала, электрона и электронно-возбужденной молекулы ДНК. При непрямом типе повреждения ДНК происходит радиолиз воды, которая в зависимости от типа клетки и стадии ее роста и развития может составлять до 90% массы клетки. В результате ионизации молекулы воды могут образоваться:

- свободные радикалы гидроксила (HO·);
- свободные радикалы водорода (H·);
- гидратированный электрон ($e_{гидр}$).

Эти радикалы в дальнейшем могут вступить во взаимодействие с возбужденной молекулой воды и кислородом тканей, дополнительно образуя активные формы кислорода (АФК):

- пероксид водорода (H_2O_2);
- радикал гидропероксида ($HO\cdot_2$);
- супероксид ($O\cdot_2$);
- атомарный кислород (O·).

Активные формы кислорода могут выступать в качестве индукторов клеточных ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

Основную опасность для молекулы ДНК представляет высокореактивный гидроксилрадикал HO·, который может индуцировать до 70% всех повреждений, возникающих в ДНК.

В процессе нормального клеточного метаболизма также образуются активные формы кислорода и вещества, потенциально имеющие токсический эффект, что в конечном счете может затруднять определение генетических изменений, возникших именно за счет радиационно-индуцированных АФК и цитотоксинов, дополнительно образовавшихся под действием ионизирующего излучения в малых дозах. Поэтому точно предсказать степень зависимости доза – эффект – очень сложная задача.

В среднем количество эндогенных двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, возникающих за сутки, в 10^3 раз выше, чем аналогичных нарушений, индуцированных за счет естественного радиационного фона. Но при хроническом воздействий дополнительных доз ионизирующего излучения с низкой ЛПЭ вероятность возникновения радиационно-индуцированных двухцепочечных разрывов относительно других типов изменения ДНК в 10^4 раз выше, чем индуцированных эндогенно. В отличие от АФК, образующихся в норме в клетке, радикалы, возникающие вдоль радиационного трека, локально кластеризованы в высоких концентрациях. По этой причине они способны вызывать и кластеризованные изменения макромолекул. При этом плотноионизирующие излучения (например, α-частицы) вызывают более сложные и тяжелые репарируемые нарушения, чем редкоионизирующие излучения (жесткий ультрафиолет, рентгеновские и γ-лучи).

Такие локальные кластеры повреждений ДНК могут состоять из нескольких разрывов или групп модифицированных оснований, расположенных на близком расстоянии друг от друга. В этом случае ферменты репарации уже не в состоянии гарантированно справляться со своей задачей. Бывает и так, что однонитевые разрывы расположены на противоположных нитях ДНК и при репарации могут легко переходить в двунитевые, а восстановление нескольких близко расположенных двунитевых разрывов может осуществляться с нарушением порядка нуклеотидов («липкие концы» воссоединяются без учета их принадлежности по принципу «сшивает то, что ближе»).

Однако в клетках имеются механизмы как для предотвращения возникновения, так и для репарации повреждений ДНК. Например, свободные радикалы могут инактивироваться при их захвате так называемыми молекулярными ловушками. К перехватчикам свободных радикалов относятся аскорбат, токоферол и другие вещества.

В результате оксидативного повреждения ДНК могут образовываться:

- модифицированные основания;
- сайты (места) с выпавшими нуклеотидами одной из комплементарных цепей ДНК;
- деструкция дезоксирибозы в нуклеотидах;
- появление одно- и двунитевых разрывов ДНК;
- сшивки ДНК / белок, играющие существенную роль при считывании генетической информации и при редупликации ДНК.

В клетке имеется несколько механизмов репарации, каждый их которых исправляет определенный вид структурных повреждений ДНК. Одновременно в клетках млекопитающих существует и ферментативный каскад, обеспечивающий элиминацию модифицированных азотистых оснований, подвергшихся окислению.

В процессе свободнорадикального повреждения ДНК образуется более 100 типов окисленных оснований, из которых наиболее распространенным является 8-оксо-2′-дезоксигуанозин (8-oxo-dG) (рис. 3.7).

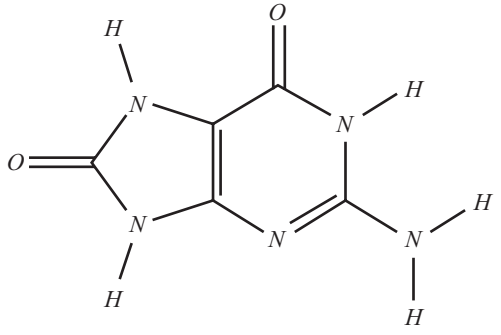

Рис. 3.7. Структурная форма 8-оксо-2′-дезоксигуанозина

Обычно в случае наличия окисленных оснований в ДНК клетка задействует эксцизионную репарацию оснований в качестве основного механизма восстановления исходной последовательности ДНК, используя в качестве матрицы нативную нить двуспиральной ДНК. Если все же эксцизионная репарация оказывается недостаточно эффективной, то изменения в ДНК копируются при репликации. Это ведет к формированию мутантного генотипа и может способствовать канцерогенезу.

В случае невозможности завершения репарации до начала репликации в клетке, если она играет существенную роль в организме и важна для сохранения его жизнеспособности, срабатывает механизм толерантности к повреждениям ДНК, который позволяет избежать остановки репликации. В таком случае репликация через невосстановленные участки происходит с помощью особых ДНК-полимераз, работающих достаточно не точно для того, чтобы пропустить дефектный участок. Этот процесс носит название «синтез ДНК на поврежденной матрице».

Если свободные радикалы взаимодействуют с дезоксирибозой, то может произойти разрыв сахаро-фосфатного остова ДНК, следствием которого является образование одно- и (или) двунитевых разрывов. Если однонитевые разрывы локализованы близко друг от друга, то они могут легко переходить в двунитевые, которые наиболее опасны для клетки, в противном случае репарационные системы легко восстанавливают повреждения благодаря сохранности второй нити ДНК.

Как говорилось ранее, двунитевые разрывы происходят при воздействии рентгеновского излучения даже в очень малых дозах – около 1 мГр. Доза облучения в 1 мГр приводит к возникновению в среднем

лишь одного трека на ядро, что индуцирует двухцепочечные разрывы примерно в 3% облученных клеток. Однако в силу того что при малых воздействиях не в полной мере активируется негомологичная репарация, двухцепочечные разрывы, вызванные такими дозами, крайне опасны. В интервале доз облучения от 0,01 до 1 Гр возникает до 30 двухцепочечных разрывов ДНК на клетку.

Двунитевые разрывы являются первичными молекулярными событиями, ведущими к гибели клетки, а их количество, как правило, коррелирует с выраженностью цитотоксического эффекта ИИ. Ошибочная репарация двунитевых разрывов может привести к хромосомным обменам, в результате которых формируются нестабильные дицентрические хромосомы или ацентрические хромосомные фрагменты, ведущие преимущественно к снижению жизнеспособности клетки-носительницы, а также к формированию сбалансированных транслокаций, основная угроза которых связана с последующим возможным озлокачествлением клетки-носительницы за счет запуска онкогенного каскада генов вследствие перераспределения генетического материала (так называемый эффект положения).

Для устранения двунитевых разрывов ДНК в клетке существуют механизмы гомологичной рекомбинации и негомологичного воссоединения разорванных концов. Выбор клеткой того или иного способа репарации зависит и от стадии клеточного цикла. Негомологичное воссоединение происходит преимущественно на стадии G_1, гомологичная рекомбинация – на стадиях S и G_2.

Поскольку гомологичная рекомбинация использует участки ДНК с полной гомологией на протяжении нескольких сотен нуклеотидов, ее отличительной чертой является безошибочность, т.е. восстановление первоначальной последовательности ДНК в сайте разрыва идет достаточно эффективно. Негомологичное воссоединение, напротив, полностью игнорирует принцип гомологии и поэтому само может являться источником ошибок, что проявляется в изменениях последовательности нуклеотидов в сайте репарации и, как следствие, ведет к закреплению мутационного события в геноме либо стимулирует экспрессию эпигеномной изменчивости. Обычно этот механизм ведет к образованию микроделеций или инсерций в сайте разрыва, реже – к крупным хромосомным перестройкам. Механизм формирования хромосомных аберраций при неправильном восстановлении двунитевых разрывов до конца еще не понят, но уже сейчас очевидна его опасность для сохранения генетического единообразия.

Суммируя приведенную выше информацию, можно констатировать, что конечный продукт радиационного мутагенеза обусловлен противодействием двух процессов: повреждения и репарации ДНК (рис. 3.8).

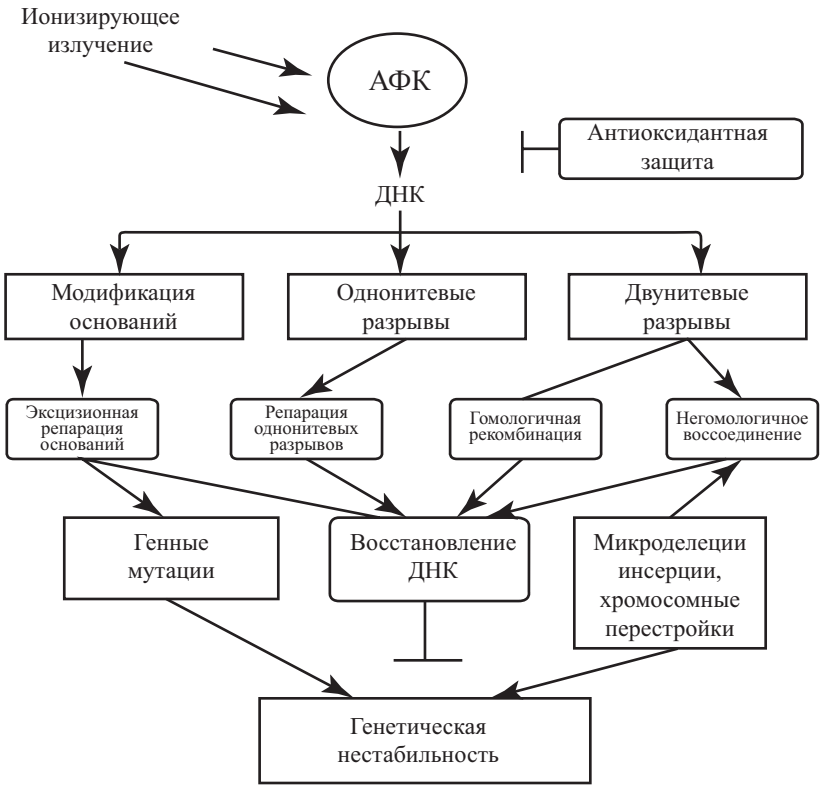

Рис. 3.8. Принципиальная схема процессов радиационно-индуцированного повреждения и репарации ДНК

Хотя ионизирующая радиация (ИР) не обладает специфическим мутагенным действием, характер индуцируемых нарушений делает их сложными для восстановления каскадом ферментов репарации. По-видимому, именно эти нарушения генетического материала и ведут к развитию отсроченной генетической нестабильности и опухолевой трансформации клеток. Следует отметить также, что нарушение любого из механизмов репарации приводит к росту радиочувствительности конкретной клетки и организма в целом и ведет к формированию состояния генетической нестабильности.

Однако облучение не всегда приводит к индукции мутаций в половых клетках непосредственно облученных особей. В некоторых случаях

индуцируются такие эпигенетические изменения, которые ведут к увеличению уровня мутагенеза и могут проявляться у потомков облученных организмов.

Контрольные вопросы

1. Какие продукты могут образовываться в результате радиационно-индуцированной ионизации молекул воды?
2. В результате какой реакции могут образовываться АФК? Какие АФК вы можете перечислить?
3. Какую опасность представляют АФК для ДНК?
4. В чем заключается опасность хронического воздействия дополнительных доз ионизирующего излучения с низкой ЛПЭ?
5. Какие изменения в клетке происходят в результате оксидативного повреждения ДНК?
6. Какое наиболее распространенное основание образуется в процессе свободнорадикального повреждения ДНК? Какая его формула?
7. Какой механизм задействует клетка для восстановления исходной последовательности в случае наличия окисленных оснований в ДНК?
8. В чем заключается суть процесса, который носит название «синтез ДНК на поврежденной матрице»?
9. Какие последствия возникают при взаимодействии свободных радикалов с дезоксирибозой?
10. При каких дозах возникают двунитевые разрывы и в чем их опасность?
11. Как можно охарактеризовать механизмы, существующие в клетке для устранения двунитевых разрывов ДНК?
12. К каким последствиям приводит нарушение любого из механизмов клеточной репарации?

3.5.2. Пострепликационная репарация ДНК

Одной из особых форм репарации является ее пострепликационная форма. Она происходит тогда, когда в ДНК возникает так много повреждений, что в ходе эксцизионной репарации клетка не успевает их полностью устранить, а также тогда, когда повреждены гены, контролирующие синтез ферментов, участвующих в эксцизионной репарации. В результате после репликации такой ДНК в дочерней цепи на месте повреждений, имеющихся в материнской нити, образуются бреши.

Пиримидиновый димер задерживает продвижение ДНК-полимеразы в ходе репликации. Она останавливается. Продолжение репликации происходит с участием фрагмента Оказаки.

Репарация идет путем рекомбинации (обмена фрагментами) между двумя вновь образованными двойными спиралями ДНК. Примером такой пострепликационной репарации может служить восстановление

нормальной структуры ДНК при возникновении тиминовых димеров (Т–Т), когда они не устраняются самопроизвольно под действием видимого света (световая репарация) или в ходе дорепликативной эксцизионной репарации.

Ковалентные связи, возникающие между рядом стоящими остатками тимина, делают их не способными к связыванию с комплементарными нуклеотидами. В результате во вновь синтезируемой цепи ДНК появляются разрывы (бреши), узнаваемые ферментами репарации. Восстановление целостности новой полинуклеотидной цепи одной из дочерних ДНК осуществляется благодаря рекомбинации с соответствующей ей нормальной материнской цепью другой дочерней ДНК. Образовавшийся в материнской цепи пробел затем заполняется посредством синтеза на комплементарной ей полинуклеотидной цепи. Проявлением такой пострепликационной репарации, осуществляемой посредством рекомбинации между цепями двух дочерних молекул ДНК, можно считать нередко наблюдаемый обмен материалом между сестринскими хроматидами.

Контрольные вопросы

1. В каких случаях происходит пострепликационная репарация ДНК?
2. Каким путем проходит процесс репарации?
3. Какой процесс нередко наблюдается при пострепликационной репарации?

3.5.3. SOS-репарация

Существование этой системы впервые постулировал М. Радман в 1974 г. Он же дал название этому механизму, включив в него международный сигнал бедствия «SOS». И действительно, эта система включается тогда, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что это угрожает жизни клетки. В данном случае происходит индукция разных генов, задействованных в различных клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК. Включение тех или иных генов, определяемых количеством повреждений в ДНК, приводит к разным по значимости клеточным ответам (начиная со стандартной репарации поврежденных нуклеотидов и заканчивая подавлением клеточного деления).

Наиболее изучена SOS-репарация у E. coli, главными участниками которой являются белки, кодируемые генами Rec A и Lex A. Первый из них представляет собой полифункциональный белок Rec A, участвующий в рекомбинации ДНК. Второй (белок Lex A) является репрессором транскрипции большой группы генов, предназначенных для репарации ДНК. При его ингибировании или разрушении SOS-репарация активируется. Связывание Rec A с Lex A приводит к расщеплению последнего и соответственно к активации транскрипции генов репарации. SOS-система репарации выявлена не только у бактерий, но и у животных и человека.

Начало SOS-ответа определяется взаимодействием белка Rec A с белком-репрессором Lex A (рис. 3.9). Ответ клетки на повреждающее воздействие начинается с активации протеазной активности белка Rec A.

Гены	Последствия активации гена
Uvr A, B, C, D	Репарация поврежденной вторичной структуры ДНК
Rec A	Пострепликационная репарация индукции SOS-системы
Lex A	Выключение SOS-системы
Rec N, ruv	Репарация двунитевых разрывов
Ssb	Обеспечение рекомбинационной репарации
Umu C, D	Мутагенез, вызванный изменениями свойств ДНК-полимеразы
Sul A	Подавление клеточного деления

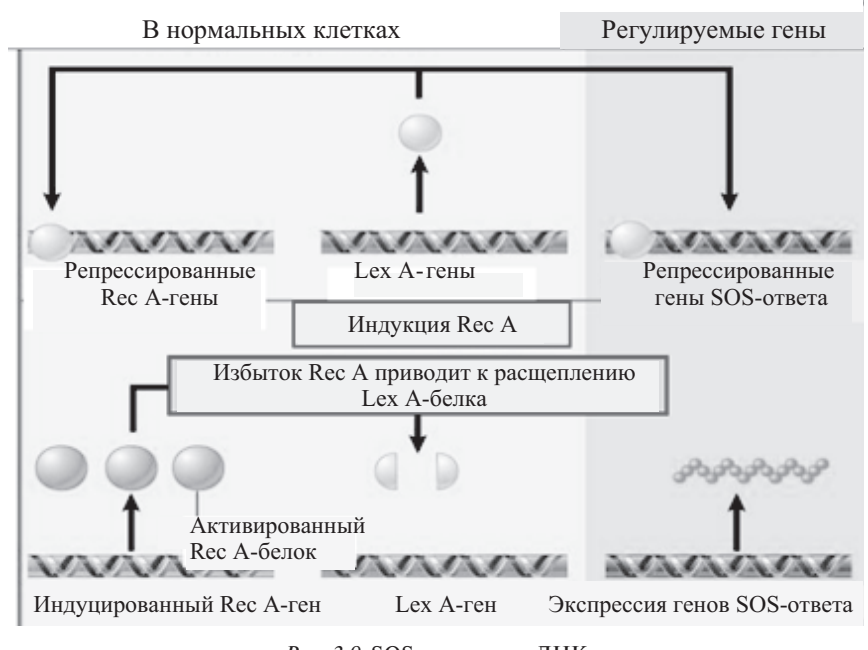

Рис. 3.9. SOS-репарация ДНК

Активирующим сигналом может быть присутствие одноцепочечной области в сайте повреждения. Активируясь, Rec A-протеаза разрезает белок-репрессор Lex A. Белок Lex A в неповрежденных клетках функционирует как репрессор многих оперонов, гены которых отвечают за различные репарационные функции.

Протеолитическое разрезание репрессора (белка Lex A) индуцирует все эти опероны. В настоящее время идентифицировано около 40 генов, которые участвуют в SOS-ответе в результате активации их продуктов. Все эти гены являются индуцибельными.

Установлено, что белок Lex A репрессирует гены-мишени, связываясь с последовательностью ДНК длиной около 20 пар оснований, названной SOS-блоком.

Контрольные вопросы

1. Кем и в каком году была открыта SOS-репарация?
2. В каких случаях включается система SOS-репарации?
3. Как можно охарактеризовать процесс SOS-репарации ДНК у E. coli?

3.5.4. Mismatch-репарация (репарация ошибочно спаренных нуклеотидов)

Во время репликации ДНК бывают ошибки спаривания, когда вместо комплементарных пар А – Т, Г – Ц образуются некомплементарные пары. Неправильное спаривание затрагивает только дочернюю цепь. Система репарации Mismatch (мисмэтч) должна найти дочернюю цепь и произвести замену некомплементарных нуклеотидов.

Специальные ферменты метилазы присоединяют метильные группы к аденинам в последовательности ГАТЦ на материнскую цепь, и она становится метилированной в отличие от неметилированной дочерней. У E. coli продукты четырех генов отвечают за мисмэтч-репарацию: mut S, mut L, mut H, mut U.

Нарушение механизмов репарации может привести к формированию злокачественного клеточного фенотипа и, как следствие, – к раку.

Контрольные вопросы

1. Какие ошибки могут происходить во время репликации ДНК?
2. Каков механизм системы репарации Mismatch?
3. К каким последствиям может привести нарушение механизмов репарации?

Глава 4

РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

4.1. Механизмы клеточного деления

Увеличение числа клеток, как постулирует клеточная теория, происходит исключительно за счет деления исходной клетки, предварительно удвоившей свой генетический материал.

Это – главное событие в жизни клетки как таковой, а именно завершение воспроизведения себе подобного. Деление клетки – процесс неслучайный, строго генетически детерминированный.

По способности к делению все клетки взрослого организма подразделяются на три типа:

1) митотические, т.е. постоянно делящиеся, клетки (клетки базального слоя эпителия; гемопоэтические клетки начальных стадий созревания, сперматогонии;

2) условно постмитотические клетки, сохранившие способность к делению, т.е. не делящиеся при действии определенных стимулов. Чаще всего деления возобновляются при регенерации соответствующего органа или ткани (клетки печени, стволовые клетки костных, мышечных и других тканей;

3) постмитотические, т.е. неделящиеся, клетки, окончательно утратившие способность делиться (клетки всех слоев эпидермиса, кроме базального; нервные клетки; клетки сердечной мышцы; волокна скелетных мышц).

Период жизни клетки от одного деления до другого называется клеточным (митотическим) циклом (рис. 4.1).

Жизненный цикл митотически делящейся клетки состоит из четырех стадий: G_1-период (пресинтетический, или постмитотический); S-период (синтетический); G_2-период (постсинтетический, или премитотический); митоз. Стадии G_1, S, G_2 вместе составляют ***интерфазу*** (рис. 4.2).

G_1-период (***пресинтетический***, или ***постмитотический***). В этот период восстанавливается содержание цитоплазматических белков и, как следствие, происходит рост клетки (до размера материнской). Кроме того, происходит синтез белков, необходимых для репликации. Содержание ДНК в клетке – 2n. Именно в этот период принимается решение о вступлении клетки в очередной клеточный цикл или о прекращении делений.

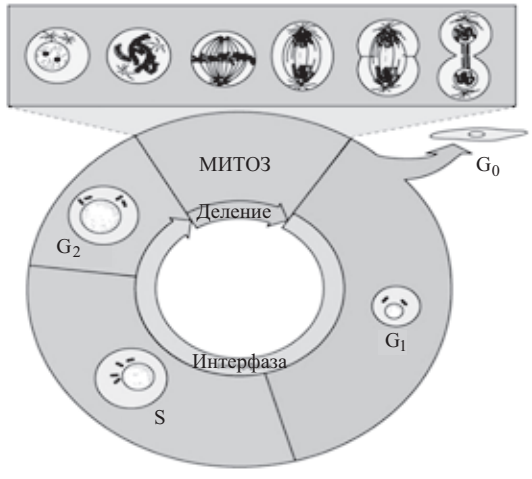

Рис. 4.1. Схема клеточного цикла и его фаз

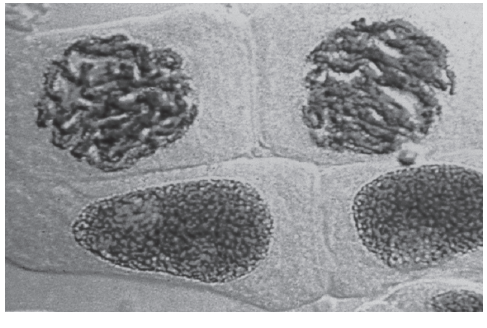

Рис. 4.2. Клетка в стадии интерфазы

***S-период* (*синтетический*).** В ядре происходит репликация (удвоение) ДНК и хромосомных белков. Содержание ДНК в ядрах соматических клеток (клеток тела) в 2 раза больше, чем в ядрах зрелых половых клеток. В синтетический период количество ДНК постепенно возрастает от 2 с до 4 с. Число хромосом не изменяется (2 n), но каждая содержит две сестринские хроматиды.

***G_2-период* (*постсинтетический*, или *премитотический*).** Не очень продолжительный период, включает синтез ряда веществ, необходимых для прохождения митоза. В частности, в это время синтезируется белок микротрубочек тубулин, необходимый для формирования веретена деления. Содержание ДНК в этот период – 4 с.

Митоз (от греч. mitos – нить). Основной способ деления эукариотических клеток – непрямое деление, приводящее к образованию двух диплоидных клеток (2 n 2 с). У клеток, вступивших в цикл деления, фаза собственно митоза – непрямого деления – занимает относительно короткое время – около 0,1 времени клеточного цикла.

Биологический смысл митоза заключается в строго одинаковом распределении редуплицированных хромосом между дочерними клетками, что обеспечивает образование генетически равноценных клеток и сохранение преемственности в ряду поколений (рис. 4.3).

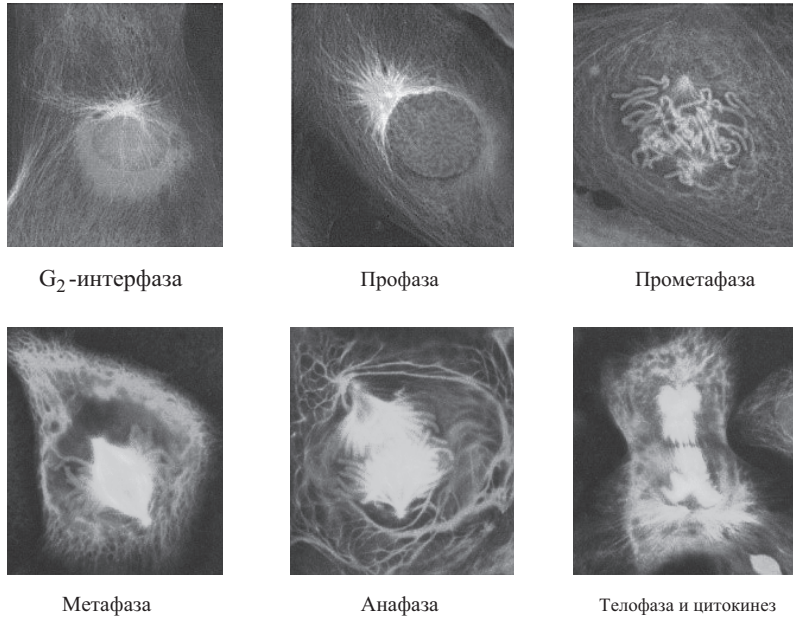

Рис. 4.3. Стадии митоза

Митоз состоит из четырех основных фаз: профаза, метафаза, анафаза, телофаза. Митоз представляет собой непрерывный процесс, поэтому границы между фазами установить достаточно трудно.

Профаза. В нее входят клетки из G_2-периода интерфазы, они после репликации в S-периоде содержат удвоенное количество ДНК (4 с) по сравнению с исходной клеткой в G_1-периоде, соответствующее таковому у тетраплоидной клетки (рис. 4.4).

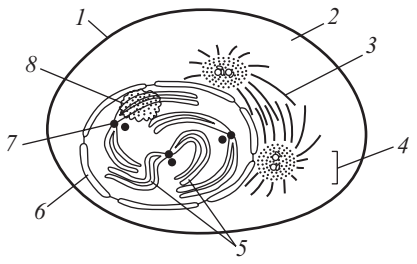

Рис. 4.4. Схема профазы митоза:
1 – плазматическая мембрана; *2* – цитоплазма; *3* – образующееся веретено; *4* – полюс веретена; *5* – конденсирующиеся хромосомы; *6* – ядерная оболочка; *7* – центромера; *8* – распадающееся ядрышко

В начале профазы в ядре начинают выявляться тонкие нити – профазные хромосомы. Это результат процесса конденсации хромосом, который совпадает с падением их транскрипционной активности. По мере прохождения профазы хромосомы укорачиваются и утолщаются. Число хромосом соответствует диплоидному количеству, но по содержанию ДНК ядра профазных клеток тетраплоидны. Каждая профазная хромосома состоит из двух взаимноспирализованных хроматид. Сестринские хроматиды связаны друг с другом с помощью белков когезинов. Таким образом, число хроматид (4 n) в профазе точно соответствует количеству ДНК (4 c).

Как следствие конденсации синтез рибонуклеиновой кислоты (РНК) на хромосомах полностью прекращается. Из-за инактивации хромосомных генов исчезают ядрышки и постепенно разрушается ядерная оболочка. С внутренней поверхностью внутренней мембраны ядра связана тонкая пластинка (*ядерная ламина*) белковой природы. Эта пластинка образована промежуточными филаментами. Ядерная ламина разрушается путем деполимеризации промежуточных филаментов, а сама ядерная мембрана распадается на мелкие пузырьки.

Аналогичный процесс происходит в цитоплазме: уменьшается количество гранулярного эндоплазматического ретикулума, он распадается на короткие цистерны и вакуоли, количество рибосом на его мембранах резко падает. Значительно редуцируется число полисом как на мембранах, так и в гиалоплазме, что определяет общее падение синтеза белка в делящихся клетках. Аппарат Гольджи также распадается на мелкие пузырьки.

В профазе также происходит образование веретена деления. Веретено деления образуется с участием центриолей и без их участия. Без центриолей веретено деления образуется у клеток высших растений и некоторых простейших. У некоторых других простейших и низших грибов образование веретена может проходить внутри ядра; в этом случае ядерная оболочка во время митоза не разрушается (закрытый митоз).

В животных клетках главная роль в образовании веретена деления отводится центриолям. Центриоли расходятся к противоположным концам клетки и формируют полюса веретена деления. От центриолей к центромерным участкам хромосом отходят микротрубочки веретена деления.

Метафаза. Она часто занимает около трети времени всего митоза. Во время метафазы путем полимеризации белка тубулина завершается формирование веретена деления, а максимально спирализованные хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости клетки и образуют так называемую метафазную пластинку (материнскую звезду) (рис. 4.5).

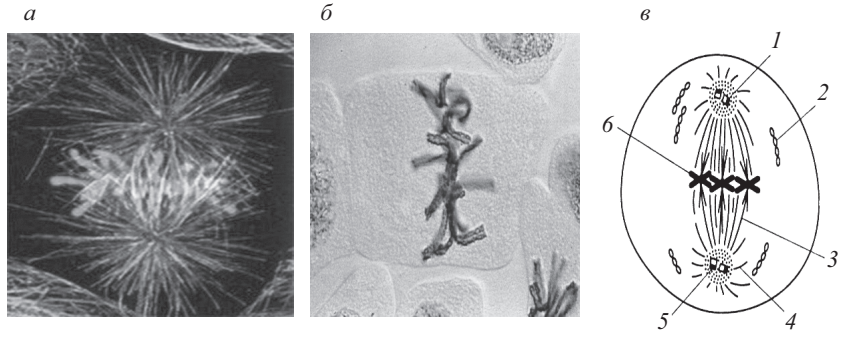

Рис. 4.5. Метафаза митоза:
а – метафазная пластинка (материнская звезда); *б* – спирализованные хромосомы; *в* – схема метафазы: *1*, *5* – полюсы веретена; *2* – фрагменты ядерной оболочки; *3* – кинетохорная микротрубочка; *4* – полюсная микротрубочка; *6* – метафазная хромосомная пластинка

В состав веретена деления входят микротрубочки трех типов: *кинетохорные* (связывают каждую хроматиду с одной из центриолей. Кинетохор – специальный белковый комплекс в области центромеры), *полярные* (идут от одной из диплосом к центру веретена, где перекрываются с микротрубочками от другого полюса), *астральные* (направлены от центромеры к поверхности клетки).

Постепенно в хромосомах разрушаются когезиновые комплексы между сестринскими хроматидами. К концу метафазы завершается процесс обособления друг от друга сестринских хроматид. Их плечи лежат параллельно друг другу и соединяются только в зоне центромер.

Анафаза. Начинается внезапно. Это самая короткая стадия митоза (рис. 4.6). Хромосомы теряют центромерные связки и синхронно начинают удаляться друг от друга по направлению к противоположным полюсам клетки. При этом они ориентированы центромерными участками к соответствующему полюсу, а теломерными – к экватору клетки. Движение хромосом осуществляется за счет сокращения микротрубочек. Происходит укорочение (разборка) кинетохорных микротрубочек и удлинение полярных микротрубочек (что ведет к расхождению самих полюсов). Кроме того, в процессе участвуют *белки-транслокаторы***.** Они перемещают хромосомы вдоль кинетохорных микротрубочек, а полярные микротрубочки – в стороны друг от друга.

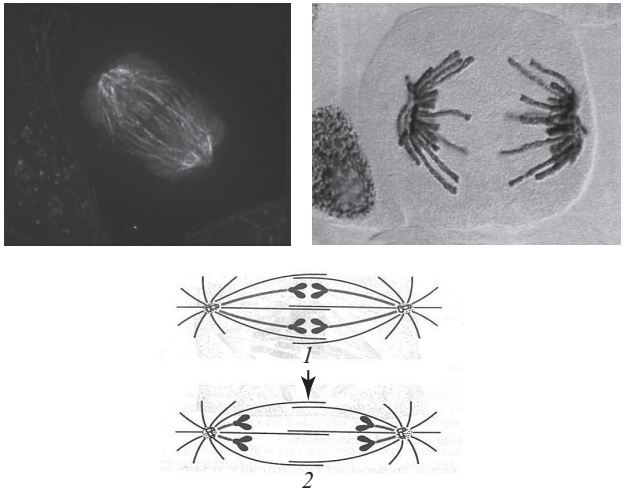

Рис. 4.6. Анафаза митоза:
1 – раздвигающая сила возникает между микротрубочками от противоположных полюсов, расталкивая их; *2* – тянущая сила действует непосредственно на полюса, растаскивая их

Телофаза. Начинается с остановки хромосом и заканчивается началом реконструкции нового интерфазного ядра и разделением исходной клетки на две дочерние (цитокинез) (рис. 4.7).

Рис. 4.7. Телофаза митоза:
1 – деконденсирующиеся хроматиды; *2* – образующаяся ядерная оболочка; *3* – полюсная микротрубочка

С хромосомами ассоциируют пузырьки, образовавшиеся в профазе из разрушенных ядерных мембран. В их стенки вновь встраиваются комплексы ядерных пор. Через поры в пузырьки проникают белки, формирующие промежуточные филаменты, которые в свою очередь образуют ядерную ламину. Благодаря этому пузырьки сливаются. Сначала

они образуют двойную оболочку вокруг каждой хромосомы. Получаются мини-ядра (кариомеры). Позднее сливаются сами кариомеры, связанные с одной диплосомой. Хромосомы постепенно деконденсируются, и начинают формироваться ядрышки.

В телофазе происходит разрушение митотического веретена деления. Для разделения клетки по экватору формируется актомиозиновое кольцо, которое постепенно сжимается, стягивая за собой плазмолемму и образуя перетяжку все уменьшающегося диаметра.

Цитокинез (***цитотомия***) – деление тела эукариотической клетки. У растительной клетки происходит путем внутриклеточного образования клеточной перегородки (рис. 4.8).

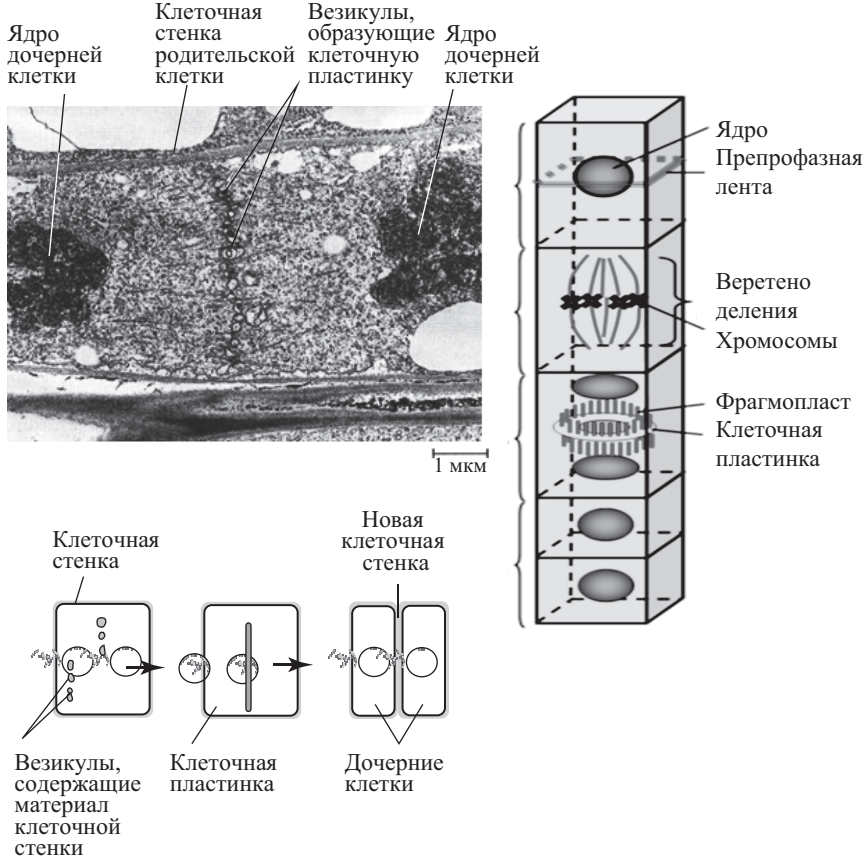

Рис. 4.8. Цитокинез у растительной клетки

Цитокенез клеток животных происходит путем перетяжки, впячивания плазматической мембраны внутрь клетки (рис. 4.9).

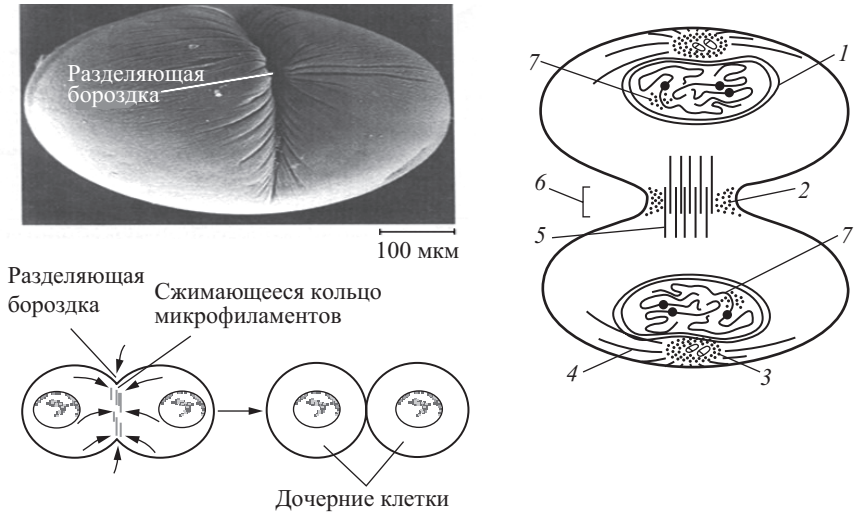

Рис. 4.9. Цитокинез у животной клетки:
1 – ядерная оболочка вокруг деконденсирующихся хромосом; *2* – сократимое кольцо, образующее борозду деления; *3* – центриоли; *4* – интерфазные микротрубочки; *5* – остатки полюсных микротрубочек; *6* – остаточное тельце (область перекрывания микротрубочек); *7* – вновь образующееся ядрышко

Во время клеточного (митотического) цикла смена стадий происходит строго упорядочено.

Делящиеся клетки могут продолжать делиться или временно прекратить деления, выйти из цикла. О таких клетках говорят, что они вступили в G_0-период. Кроме того, в зависимости от ряда обстоятельств клетка может вступить в процесс *дифференцировки*, включить механизм самоуничтожения (апоптоз) либо подвергнуться бласттрансформации, т.е. превратиться в опухолевую клетку.

Контрольные вопросы

1. На какие типы по способности к делению подразделяются все клетки взрослого организма?
2. Из каких стадий состоит жизненный цикл митотически делящейся клетки? Какие процессы происходят на каждой из стадий?
3. Как можно охарактеризовать профазу митоза?
4. В чем заключаются особенности метафазы митоза?
5. Какие процессы происходят в анафазе митоза?

6. Что происходит с хромосомами в телофазе митоза? Каков итог этой стадии?
7. В чем состоит отличие цитокинеза растительной клетки от животной клетки?

4.2. Регуляция клеточного цикла

Ключевую роль в смене фаз клеточного цикла играют специальные ферменты – *протеинкиназы.* Это так называемые *циклинзависимые киназы* (Cdk – cyclin-dependentkinases). Киназа представляет собой комплекс, состоящий из двух полипептидов. Один из них, Cdk, связывает АТФ и содержит активный центр. Однако он обладает киназной активностью, только будучи связан с другим полипептидом, называемым циклином (рис. 4.10).

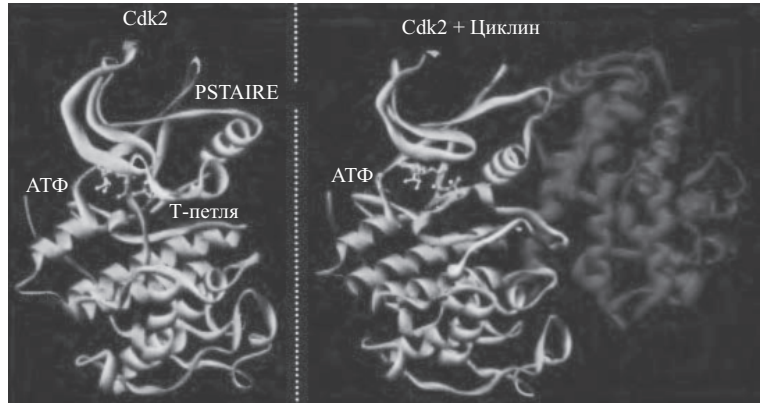

Рис. 4.10. Связывание циклина А с Cdk вызывает в ней конформационные изменения

Т-петля изменяет свое положение, что обеспечивает доступ субстратов. Также происходит реориентация боковых цепей некоторых аминокислот, в результате чего индуцируются изменения, необходимые для переноса фосфатных групп.

Связывание с циклином вызывает конформационные изменения в молекуле Cdk, в результате которых субстрат получает доступ к каталитическому центру. Активность каждого комплекса Cdk с циклином изменяется таким образом, что проявляется только в определенные фазы клеточного цикла, а в остальное время комплекс остается в неактивном состоянии.

Название «циклины» обусловлено цикличным изменением концентрации данного белка в течение клеточного цикла. При взаимодействии образуется активный комплекс – *циклин-Cdk* (рис. 4.11).

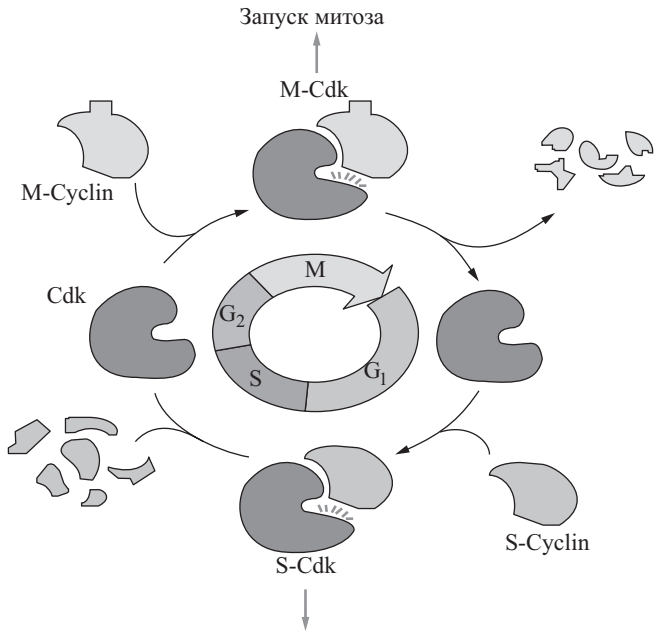

Рис. 4.11. Общая схема регуляции клеточного цикла

Существует несколько видов циклинов и несколько видов Cdk (разные циклины обозначаются латинскими буквами, а разные Cdk – арабскими цифрами (рис. 4.12)).

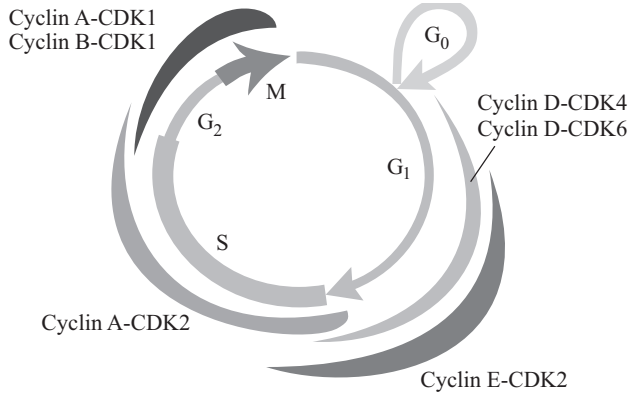

Рис. 4.12. Циклины высших эукариот

У большинства организмов на протяжении каждого клеточного цикла действует много циклинов, причем эти разные белки появляются и исчезают на разных стадиях. При этом в зависимости от названия фазы клеточного цикла, в течение которой они присутствуют, циклины подразделяются на три класса:

- 1-й класс – G_1-циклины, ответственные за продвижение цикла от фазы G_1 к S-фазе;
- 2-й класс – S-фазные циклины, которые необходимы для инициации репликации ДНК;
- 3-й класс – M-фазные, или митотические, циклины, инициирующие митоз.

Во многих клетках находится более одного представителя каждого класса циклинов; даже такие простые эукариоты, как дрожжи S. cerevisiae, содержат девять различных циклинов. Все девять взаимодействуют с одной и той же каталитической субъединицей. Поскольку каталитическая субъединица в каждом Cdk-комплексе одна и та же, циклиновые субъединицы должны не только активировать субъединицу киназы, но также распознавать белки, которые необходимо фосфорилировать.

Наряду со многими классами циклинов для большинства многоклеточных эукариот характерно присутствие нескольких представителей каждого класса (которые обозначаются как циклин B_1, B_2 и т.д.). Таким образом, общее количество циклинов достаточно велико. Например, геном человека кодирует по меньшей мере 12 циклинов, которые участвуют в регуляции клеточного цикла.

Несмотря на то что различные представители семейства циклинов появляются в различное время цикла и в различных участках клетки, они обладают общими молекулярными свойствами. В первичной структуре у них присутствует последовательность, состоящая примерно из 150 аминокислот, которая называется циклиновым доменом. Эта последовательность представляет собой область, посредством которой циклин связывается с каталитической субъединицей Cdk. Вне циклинового домена первичная последовательность циклинов существенно варьирует по составу, хотя многие циклины содержат там гидрофобный участок, участвующий в узнавании субстрата.

Несмотря на различия, среди циклинов существует значительная функциональная избыточность и один циклин может заменить другой, хотя и не всегда с одинаковым результатом. Такая избыточность впервые была обнаружена у дрожжей и сейчас показана для клеток мышей. Например, в отсутствие циклина E мыши развиваются и живут нормально. Не исключено поэтому, что другие циклины компенсируют потерю этого циклина, участвующего в инициации S-фазы, хотя обычно они не выполняют присущие ему функции.

Большинство киназ связывается с одним или двумя различными циклинами, причем для каждой Cdk существует свой набор циклинов. Поэтому в тот или иной момент времени в клетке находится много разных Cdk-циклиновых комплексов. Разные сочетания субъединиц Cdk и циклинов позволяют достигнуть очень тонкой регуляции в определенные моменты жизни клетки и в определенном месте. Это относится как к отдельной клетке, так и к многоклеточному организму. Также следует иметь в виду, что для каждого Cdk-циклинового комплекса существует определенный набор субстратов. Стадии цикла клеток, в которых действуют различные циклины представлены на рис. 4.13.

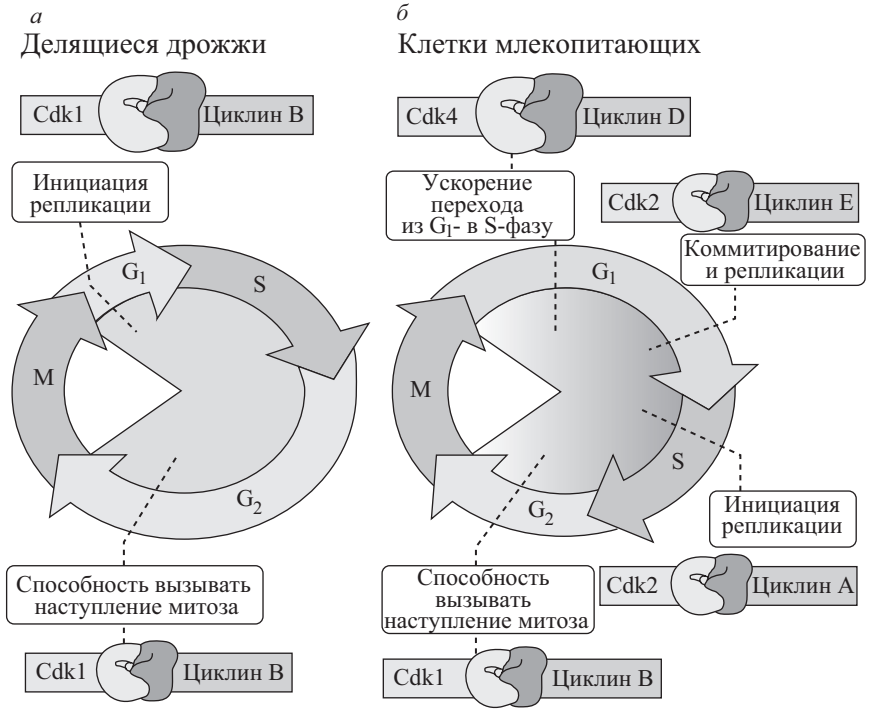

Рис. 4.13. Комплексы Cdk-циклин в клетках дрожжей (*а*) и млекопитающих (*б*)

В клетках делящихся дрожжей (рис. 4.13, *а*) различные переходы контролируются единственным Cdk-комплексом (Cdk1-циклин B). В клетках млекопитающих (рис. 4.13, *б*) эти же задачи выполняют различные Cdk-циклиновые комплексы.

Различные протеинкиназы проявляют активность в различные фазы клеточного цикла. Некоторые активны в G_1-период, другие – в момент репликации клеточной ДНК, а остальные – в митозе. В течение относительно недолгого периода активности каждая киназа фосфорилирует большое количество белков, что приводит либо к их активации и запуску основных событий клеточного цикла, либо к ингибированию их активности, при котором предотвращается повторение предыдущего события цикла.

Например, Cdk, которая инициирует митоз, фосфорилирует белки ламины, при этом происходит разрушение ядерной оболочки. Также фосфорилируется большой набор других белков, которые регулируют сборку митотического веретена. Каждая из них фосфорилирует определенные белки, вовлеченные в соответствующую фазу цикла, они меняют свою конфигурацию и таким образом активируют или инактивируют их.

Чтобы клетка вступила в митотический цикл (МЦ), она должна получить на мембрану митогенный сигнал, который должен дойти до ядра. Перенос митогенного сигнала начинается с активации ростовых факторов (белков-митогенов).

Комплекс Cdk-циклин очередной стадии цикла должен обеспечить:

- инактивирование комплекса предыдущей стадии;
- стимуляцию событий своей стадии;
- образование или активацию комплекса следующей стадии.

Запускают цикл комплексы CD (1-3)-Cdk4, 6. Они функционируют на начальной стадии постмитотического (G_1) периода и вызывают соответствующие внутриклеточные события (рост клетки, синтез белков для репликации).

В ходе цикла клетка осуществляет самоконтроль собственного состояния. Для этого в цикле существует несколько контрольных точек (рис. 4.14):

- контрольная точка G_1-периода. Остановка цикла осуществляется в случае обнаружения двухцепочечных разрывов в ДНК, неправильной сегрегации хромосом или разрушения системы микротрубочек;
- контрольная точка S-периода. Остановка цикла осуществляется в случае недостатка нуклеотидов в клетке;
- контрольная точка G_2-периода. Остановка цикла в случае незавершенности репликации каких-либо участков хромосом либо крупных повреждений ДНК, оставшихся с прошлого периода;
- контрольная точка метафазы митоза. Остановка цикла осуществляется в случае неправильной сборки веретена деления.

Главное, что подвергается контролю, – это состояние генетического материала (рис. 4.15).

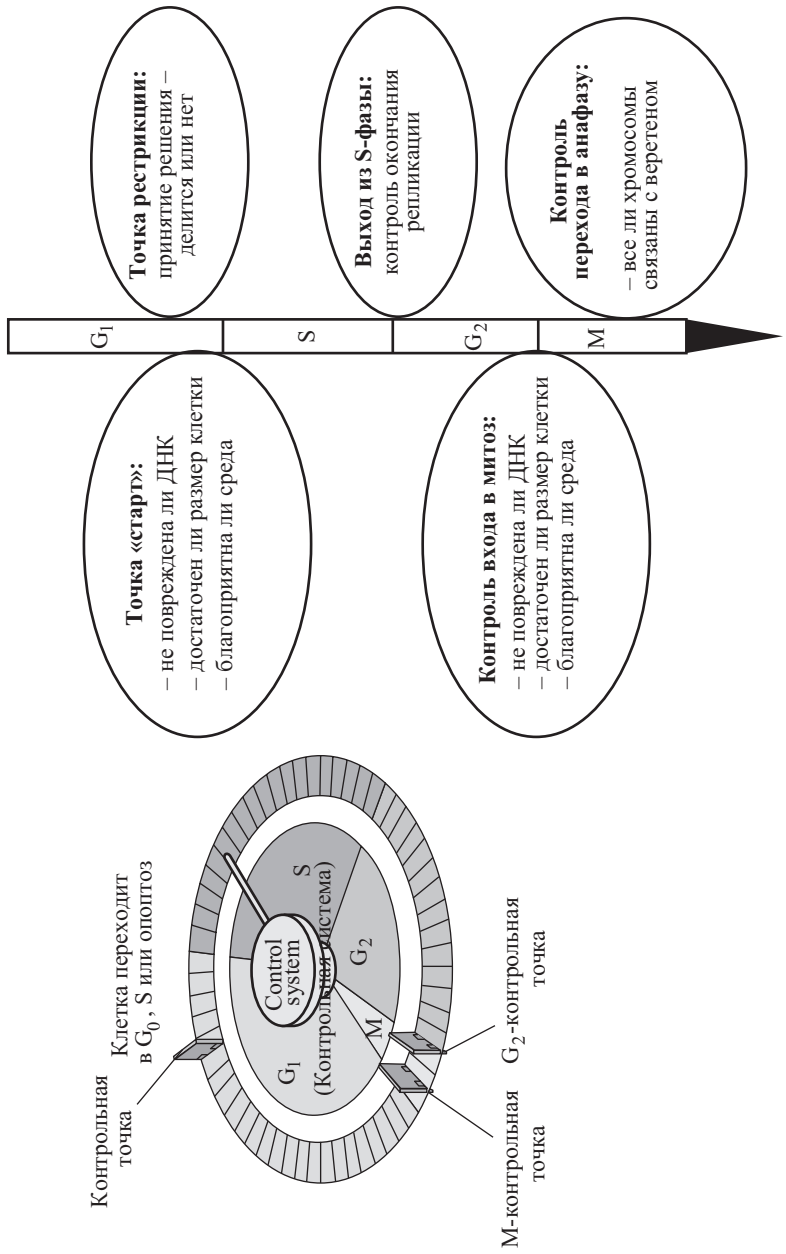

Рис. 4.14. Контрольные точки клеточного цикла

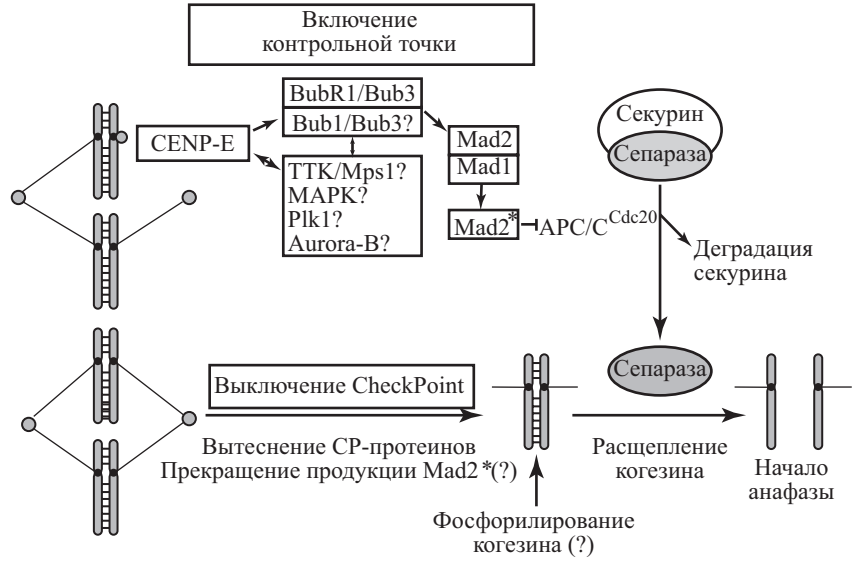

Рис. 4.15. Схема контроля клеточного цикла

В зависимости от результатов «проверки» выбирается один из вариантов дальнейших действий:

- безостановочный переход к следующей фазе цикла;
- более или менее длительная задержка на текущей стадии для исправления обнаруженных дефектов, если такое возможно;
- запуск механизма апоптоза (программируемой клеточной смерти), если нарушения неисправимы.

Например, в предмитотический период в клетке нарастает концентрация циклина B. Циклин B соединяется с неактивной формой циклин B-зависимой протеинкиназы и активирует ее. Активная протеинкиназа фосфорилирует и тем самым активирует ряд ферментов и других белков, необходимых для митоза (в частности, белки, участвующие в образовании митотического веретена и в расхождении хромосом).

Предполагается, что двухцепочечные разрывы узнаются специальной протеинкиназой. В большинстве случаев хромосомных повреждений центральную роль в остановке цикла играет белок p53. Он синтезируется в клетке постоянно, но очень быстро разрушатся. При наличии в клетке хромосомных повреждений ДНК-протеинкиназа фосфорилирует белок p53, он становится активным. Активный белок p53 является транскрипционным фактором для гена белка p21, который является

ингибитором всех комплексов циклин-Cdk. По этой причине происходит остановка цикла, в каком бы его периоде не находилась клетка.

Если повреждения хромосом достаточно велики и их исправление затягивается, то длительно сохраняющий активность белок p53 начинает стимулировать как транскрипционный фактор группу генов, запускающих апоптоз. В результате в клетке начинает выполняться сложная программа самоуничтожения. Дефектная клетка распадается на фрагменты и фагоцитируется соседними клетками.

Несмотря на большое количество защитных механизмов (ферменты репарации, контроль за процессами митоза, апоптоз и др.), они не являются стопроцентными. При определенных условиях возможно образование клеток с дефектным генотипом:

- может оказаться несбалансированный набор хромосом (в случае нерасхождения хромосом за счет нарушения веретена деления);
- могут образовываться полиплоидные клетки (в результате неразделения цитоплазмы);
- могут присутствовать различные мутации.

В случае модифицирования генов, ответственных за процессы клеточного деления, клетка может потерять контроль над делением и превратиться в опухолевую. К онкогенезу могут иметь отношение 120–150 генов человека и некоторое количество вирусных генов.

Подводя итог изложенному, подчеркнем, что переход клеток в разные стадии цикла регулируется Cdk-циклиновыми комплексами. Циклины представляют собой белки, уровень которых в клетке меняется в зависимости от фаз цикла. Таким образом, специфичность различных фаз клеточного цикла определяется активностью Cdk, которая регулируется циклинами.

Контрольные вопросы

1. Каким образом и какие ферменты играют ключевую роль в смене фаз клеточного цикла?
2. На какие классы подразделяются циклины?
3. Какими общими молекулярными свойствами обладают циклины?
4. Каким образом достигается очень тонкая регуляция жизни клетки в определенном месте и в определенные моменты?
5. Что должен обеспечить комплекс Cdk-циклин очередной стадии цикла?
6. Какие основные контрольные точки клеточного цикла можно назвать? Какие события на них происходят?
7. Какие варианты дальнейших действий выбираются в зависимости от результатов «проверки» контрольных точек клеточного цикла?
8. Какие процессы предположительно происходят при двухцепочечных разрывах ДНК?

9. В результате каких процессов могут образовываться клетки с дефектным генотипом?
10. В каком случае нормальная клетка может трансформироваться в опухолевую?

4.3. Роль внутриклеточных белков в регуляции клеточного цикла

Наличие контрольных точек в клеточном цикле необходимо для определения завершения его каждой фазы. Остановка клеточного цикла происходит в случаях:

- повреждения ДНК в G_1-периоде;
- неполной репликации ДНК в S-фазе;
- повреждения ДНК в G_2-периоде;
- нарушения связи веретена деления с хромосомами.

Одним из контрольных пунктов в клеточном цикле является собственно митоз, который не переходит в анафазу при неправильной сборке веретена и при отсутствии полных связей микротрубочек с кинетохорами.

Повреждения ДНК препятствуют вхождению клеток в S-период или в митоз. Если эти повреждения не катастрофические и могут быть восстановлены за счет репаративного синтеза ДНК, то блок клеточного цикла снимается и цикл доходит до своего завершения.

Если же повреждения ДНК значительные, то каким-то образом происходят стабилизация и накопление белка p53, концентрация которого в норме очень низкая из-за его нестабильности. Белок p53 является одним из факторов транскрипции, который стимулирует синтез белка p21, являющегося ингибитором комплекса Cdk-циклин. Это приводит к тому, что клеточный цикл останавливается на стадии G_1 или G_2. При блоке в G_1-периоде клетка с повреждением ДНК не вступает в S-фазу, так как это могло бы привести к появлению мутантных клеток, среди которых могут быть и опухолевые клетки. Блокада в G_2-периоде также предотвращает процесс митоза клеток с повреждениями ДНК. Такие клетки с блокированным клеточным циклом в дальнейшем погибают путем апоптоза.

При мутациях, приводящих к потере генов белка p53 или их изменениям, блокады клеточного цикла не происходит, клетки вступают в митоз, что приводит к появлению мутантных клеток, бóльшая часть из которых нежизнеспособна, другая – дает начало злокачественным клеткам.

Семейство белков Bcl-2 может модулировать прогрессию клеточного цикла. При субоптимальных условиях роста Bcl-2 обеспечивает переход клеток в покоящееся состояние и задерживает вхождение в цикл.

Транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, – это p53 (белок p53). Данный белок выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей. Свое название он получил по молекулярной массе – 53 кДа. Реальная молекулярная масса белка составляет 43,7 кДа. Погрешность в первоначальном определении молекулярной массы вызвана наличием множества остатков пролина в составе p53, которые замедляют движение белка в гене.

Ген человека, кодирующий белок p53, называется *TP53* (курсив указывает на то, что это название гена, а не белка). Этот ген расположен на хромосоме 17 (17p13.1).

Локализация гена в геноме других организмов:

- мышь – хромосома 11;
- крыса – хромосома 10;
- собака – хромосома 5;
- свинья – хромосома 12.

Человеческий белок p53 состоит из 393 аминокислотных остатков и имеет пять доменов:

- N-концевой домен, активирующий транскрипцию (англ. transcription-activationdomain; TAD), аминокислотные остатки 1–42;
- богатый пролином домен, важный для апоптотической активности p53, аминокислотные остатки 80–94;
- ДНК-связывающий домен («цинковый палец»), аминокислотные остатки 100–300;
- домен, отвечающий за олигомеризацию, аминокислотные остатки 307–355. Тетрамеризация очень важна для активности p53 *in vivo*;
- С-концевой домен, задействованный в отсоединении ДНК-связывающего домена от ДНК, аминокислотные остатки 356–393.

Белок p53 является продуктом гена-супрессора опухоли *TP53* и экспрессируется во всех клетках организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется. Активация состоит в приобретении способности связываться с ДНК и активировать транскрипцию генов, которые содержат в регуляторной области нуклеотидную последовательность, которая называется p53-response element (участок ДНК, с которым связывается белок p53, рис. 4.16).

Таким образом, p53 – фактор, который запускает транскрипцию группы генов и активируется при накоплении повреждений ДНК. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК; при сильном стрессовом сигнале – запуск апоптоза.

Белок p53 активируется при повреждениях генетического аппарата, а также при стимулах, которые могут привести к подобным повреждениям или являются сигналом о неблагоприятном состоянии клетки

Рис. 4.16. Комплекс p53 сДНК

(стрессовом состоянии). Функция белка p53 состоит в удалении из пула реплицирующихся клеток тех клеток, которые являются потенциально онкогенными (отсюда образное название белка p53 – англ. Guardianofthe genome – хранитель генома). Данное представление подтверждается тем фактом, что потеря функции белка p53 может быть установлена в ≈ 50% случаев злокачественных опухолей человека. В регуляции активности белка p53 ведущая роль принадлежит посттрансляционным модификациям белка и его взаимодействиям с другими белками.

Активация белка p53 происходит в ответ на многочисленные стрессовые стимулы:

- непосредственные повреждения ДНК (классический стимул);
- повреждения аппарата сегрегации генетического материала (например, митотического веретена);
- уменьшение концентрации свободных рибонуклеотидов;
- гипоксия;
- тепловой шок;
- высокая концентрация NO (монооксида азота);
- ионизирующее излучение.

В быстро делящихся (пролиферирующих) клетках было обнаружено увеличение концентрации белка p53 по сравнению с медленно делящимися клетками. Значение увеличения концентрации p53 в данном случае состоит в том, что клетки, которые быстро реплицируют ДНК, более

подвержены возникновению повреждений генетического аппарата, чем, например, неделящиеся клетки в фазе G_0. Следовательно, увеличение концентрации p53 – это подготовка клетки для быстрой реакции на возможное возникновение повреждений ДНК.

Очевидно, что для остановки клеточного цикла в условиях стимуляции пролиферации внеклеточными ростовыми факторами требуется более высокая концентрация p53, чем в условиях фазы G_0. Вследствие строгого посттрансляционного контроля активации белка p53 высокая концентрация белка p53 сама по себе не ведет к его активации.

Концентрация белка p53 увеличивается в результате снятия ингибирования трансляции его мРНК. Подавление трансляции происходит в результате связывания регуляторных белков с последовательностями нуклеотидов в 3′-нетранслируемой области мРНК. Модификация белка p53 приводит к его активации. Латентный (неактивный) белок p53 локализуется в цитоплазме (по крайней мере на некоторых стадиях клеточного цикла); активный белок p53 локализуется в ядре клетки. При отсутствии стрессового стимула белок p53 имеет короткий период полураспада (5–20 мин в зависимости от типа клеток). Активация белка сопряжена с увеличением его стабильности. В регуляции стабильности (и активности) белка p53 главная роль принадлежит белку Mdm2.

Активированный белок p53 является специфическим транскрипционным фактором. Гены, транскрипцию которых стимулирует белок p53, кодируют белки – компоненты апоптотической программы (проапоптотические компоненты) и белки, которые регулируют клеточный цикл.

Активированный белок p53 супрессирует транскрипцию ряда генов. Этот супрессирующий эффект не связан с супрессорной функцией комплекса Mdm2:p53, так как данный комплекс супрессирует транскрипцию тех генов, которые активируются белком p53 (не связанным с белком Mdm2). В то же время супрессорный эффект белка p53 касается другого набора генов. Репрессия транскрипции, по крайней мере частично, объясняется тем, что белок p53 формирует комплексы с неспецифическими транскрипционными факторами, среди них белок TBP (англ. TATA-boxbindingprotein; белок, который связывается с последовательностью TATA), белок CBF (англ. CCAA-Tbindingfactor; белок, который связывается с последовательностью CCAAT) и белок SP-1.

Ген p53 кодирует по крайней мере два белка с несколько различной регуляцией (две формы возникают в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК). Также существуют данные, которые указывают на возможность существования целой группы белков, родственных белку p53, наиболее охарактеризованным из них является белок p73.

Нарушение нормальной регуляции клеточного цикла является причиной появления большинства твердых опухолей. В клеточном цикле,

как уже говорилось, прохождение контрольных пунктов его возможно только в случае нормального завершения предыдущих этапов и отсутствия поломок.

Для опухолевых клеток характерны изменения компонентов сверочных точек клеточного цикла. При инактивации сверочных точек клеточного цикла наблюдается дисфункция некоторых опухолевых супрессоров и протоонкогенов, в частности p53, pRb, Myc и Ras. Белок p53 является одним из факторов транскрипции, который инициирует синтез белка p21, являющегося ингибитором комплекса Cdk-циклин, что приводит к остановке клеточного цикла в G_1- и G_2-периодах.

Таким образом, клетка, у которой повреждена ДНК, не вступает в S-фазу.

Контрольные вопросы

1. В каких случаях происходит остановка клеточного цикла?
2. Какие последствия для клеточного цикла имеют значительные повреждения ДНК?
3. Какую роль играют белки семейства Bcl-2 в регуляция клеточного цикла?
4. Какую структуру имеет ген человека, кодирующий белок p53?
5. В чем заключается функция белка p53?
6. В каких случаях происходит активация белка p53?
7. Какой белок инициирует синтез белка p21? Какова роль этого белка в регуляции клеточного цикла?

4.4. Активация контрольных точек клеточного цикла при облучении

Облучение клеток приводит к задержке их прохождения через G_1-, S- и G_2-фазы клеточного цикла. Это происходит вследствие активации контрольных точек, узнающих повреждение ДНК (табл. 4.1).

Таблица 4.1. **Активация контрольных точек клеточного цикла**

Фаза цикла	Сигнальные белки	Контрольная точка, которая активируется при облучении клеток в фазе	Свойства
1	2	3	4
G_1	ATM, p53, p21	G_1	Блокирует вступление клеток в S-фазу

Окончание табл. 4.1

1	2	3	4
S	ATM, Chk1 / Chk12, CDC25A / CDC25C, BRCA1, BRCA 2	S	Замедляет прохождение клеток по S-фазе
Ранняя G_2	ATM, Chk1 / Chk12, CDC25A / CDC25C, BRCA1, BRCA 2	G_2	Блокирует вхождение клеток в митоз
Поздняя G_2	ATR, Chk1, CDC25A / CDC25C	Все фазы	Приводит к накоплению клеток в G_2-фазе

Контрольные точки представляют определенные моменты в клеточном цикле, активируя которые можно блокировать или замедлить вхождение клеток в следующую фазу. В ответ на облучение в различные моменты цикла процессы репарации активируют четыре контрольные точки. Первоначально считали, что это точки задержки, которые позволяют клеткам иметь больше времени для репарации повреждений в ДНК.

Такое представление в какой-то степени справедливо, особенно если учитывать важность контрольных точек в предотвращении мутаций, которые в противном случае могли бы возникнуть из-за присутствия неспаренных или неправильно спаренных оснований ДНК.

Однако известно лишь ограниченное количество данных, поддерживающих такую роль контрольных точек в клеточной радиочувствительности при однократном облучении (по тесту выживаемости).

Продвижение по циклу клетки, находящейся в G_1-, S-, G_2- или M-фазе, происходит за счет действия циклинзависимых киназ (Cdks). Эти киназы фосфорилируют различные белки и запускают процесс, необходимый для прохождения клетки по циклу. Cdk активна только в том случае, когда она связана со своим партнером – циклином (отсюда и ее название) и в различных точках клеточного цикла активны различные комплексы циклин-Cdk.

Например, комплекс циклин-D-Cdk4 активен в фазе G_1, а циклин-B-Cdk1 – в митозе. Для активации контрольных точек комплексы циклин-Cdk должны быть заингибированы. В случае облучения это достигается двумя путями. Первый путь включает активацию определенных белков, непосредственно ингибирующих комплекс циклин-Cdk; это ингибиторы циклинзависимой киназы (CDKIs). Второй путь состоит в изменении степени фосфорилирования и активности самого фермента Cdk. Активность определенных Cdk часто находится под контролем фосфорилирования, и та или иная киназа может быть активной в фосфорилированном или дефосфорилированном состоянии.

Контрольные вопросы

1. Вследствие чего происходит задержка фаз клеточного цикла при облучении?
2. Какую роль играют контрольные точки в клеточном цикле при радиационном облучении?
3. Каким образом происходит активация контрольных точек при облучении?

4.4.1. G_1-блок клеточного цикла

Контрольная точка, расположенная между G_1- и S-фазами цикла, играет существенную роль в принятии клеткой решения перейти к делению. Поэтому она зависит от присутствия ростовых факторов, источников питания и других компонентов, обеспечивающих пролиферацию. Переход от G_1- к S-фазе находится под контролем фактора транскрипции E2F. Этот фактор регулирует активность многих генов, продукты которых участвуют в инициации репликации ДНК в S-фазе, и в течение G_1-периода он поддерживается в неактивном состоянии за счет связывания с белком ретинобластомы (Rb). По мере продвижения клетки из G_1-периода в S-период белок Rb фосфорилируется G_1-циклин-Cdks, которые включают циклин-D-Cdk4 и циклин-E-Cdk2. При этом происходит отщепление Rb от E2F, и последний начинает функционировать как фактор транскрипции, инициирующий переход клетки в S-фазу.

Облучение приводит к ATM-зависимой стабилизации и активации p53. Одним из генов, находящихся под положительным контролем p53, является CdkIp21(CdkNlA). Белок p21 ингибирует комплекс G_1-циклин-Cdk; при этом предотвращается фосфорилирование Rb и переход клетки в S-фазу. В результате при облучении клеток в G_1-фазе задерживается их переход в S-фазу цикла, причем эта задержка обеспечивается белками p53 и p21.

Контрольные вопросы

1. Какова роль контрольной точки, расположенной между G_1-фазой и S-фазой цикла? От каких факторов она зависит?
2. Каков механизм блокировки G_1-фазы клеточного цикла?
3. Какими белками обеспечивается функционирование данной контрольной точки при облучении? Каким образом это происходит?

4.4.2. Контрольная точка в S-фазе

Остальные контрольные точки клеточного цикла, которые активируются при облучении, контролируются двумя близкими по свойствам белками-киназами – Chk1 и Chk2 (рис. 4.17).

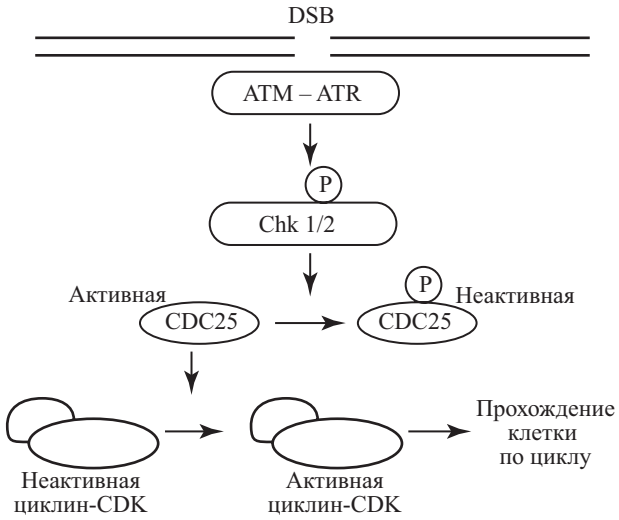

Рис. 4.17. Активация контрольных точек в S-фазе, а также в ранней и поздней G_2-фазах происходит по сходному механизму

При появлении в ДНК двунитевых разрывов (ДР) активируются белок, мутированный при атаксии телеангиоэктазии (ATM), и (или) AT-киназа (ATR). Это приводит к фосфорилированию Chkl/2-киназ. Киназы фосфорилируют и инактивируют белки CDC25A/CDC25C. Последние необходимы для прохождения клетки по S-фазе и вступления в митоз, поскольку активируют комплексы циклин-циклин-зависимой киназы в обеих фазах цикла. Таким образом, когда Chk1/2 фосфорилируются ATM, происходит активация контрольных точек в S-фазе и G_2-фазе цикла.

Белки Chkl и Chk2 активируются при фосфорилировании и являются субстратами киназ ATR и ATM соответственно.

В клетках, находящихся в момент облучения в S-фазе, наблюдается зависимое от дозы снижение скорости синтеза ДНК, в результате которого общая продолжительность репликативного периода существенно увеличивается. Белком, предотвращающим прохождение клетки по S-фазе, является Cdk2-киназа, которая при дефосфорилировании активируется. Удаление фосфатных групп в Cdk2 происходит под действием фосфатаз Cdc25A и Cdc25C.

После активации киназ Chkl и Chk2 они фосфорилируют Cdc25A и CDC25C, вызывая их инактивацию или деградацию. В итоге активация Chkl и Chk2 при действии ATR и ATM приводит к увеличению количества фосфорилированной формы Cdk2, и, таким образом, прохождение клетки по S-фазе замедляется.

Хотя активация ATM-Chk2 и ATR-Chkl и ингибирование Cdc25A/C являются основным механизмом запуска функционирования контрольной точки в S-фазе, некоторые другие белки репарации ДНК также влияют на этот процесс.

К их числу относятся белки BRCA1 и BRCA2, основной функцией которых является участие в гомологичной рекомбинации. Это свидетельствует о сложных взимоотношениях между процессами активации контрольной точки и репарацией ДНК.

Контрольные вопросы

1. Каков механизм активации контрольной точки в S-фазе клеточного цикла при облучении?
2. Какую можно начертить схему активации контрольных точек в S-фазе, а также в ранней и поздней G_2-фазах и как ее объяснить?
3. Какие белки дополнительно влияют на запуск контрольной точки в S-фазе?

4.4.3. Контрольная точка в G_2-фазе

В G_2-фазе существуют две дополнительные контрольные точки, функции которых аналогичны таковым для точек S-фазы клеточного цикла. Ранняя контрольная точка в G_2-фазе также контролируется ATM-Chk2-CDC25A/C и функционирует при облучении клеток в G_2-фазе. Эта точка активируется при воздействии относительно небольших доз радиации (достаточно дозы в 1 Гр), блокируя прохождение клетки по циклу в конце периода G_2. В этом случае ATM-Chk2-CDC25A/C воздействует на митотический комплекс циклин-B-Cdk1, специфические сайты в котором дефосфорилируются и активируются, подобно тому как это происходит с Cdk2 в S-фазе. Эта точка называется ранней G_2, поскольку относится к клеткам, которые облучены в G_2-фазе и вступление которых в митоз быстро блокируется. В результате через короткий промежуток времени после облучения отмечается снижение количества митотических клеток.

Контрольная точка в поздней G_2-фазе обеспечивает продолжительный G_2-блок и функционирует при предварительном облучении клеток в G_1-фазе или S-фазе. Прохождение таких клеток по циклу может временно блокироваться при активации контрольных точек в G_1-фазе и S-фазе, но когда они через несколько часов после этого вступают в G_2-фазу, то до вхождения в митоз у них наступает еще одна задержка.

В отличие от контрольной точки в ранней G_2-фазе этот блок сильно зависит от дозы радиации. Так, после облучения в высоких дозах блок может длиться много часов. Также в отличие от остальных эта точка поздней G_2-фазы не зависит от ATM. Вместо этого передача сигнала происходит по основному направлению от ATR к Chkl и к CDC25A/

CDC25C. Таким образом, контрольная точка в поздней G_2-фазе напоминает точки в S-фазе и ранней G_2-фазе, однако она активируется совершенно другим типом повреждений в ДНК. Эта точка не активируется ДР, и функционирование ее запускается повреждениями, которые сохраняются после завершения в ДНК репаративных процессов, причем их уровень оказывается достаточным для активации ATR.

Контрольные вопросы

1. Как функционирует ранняя контрольная точка в G_2-фазе?
2. Какова роль контрольной точки в поздней G_2-фазе?
3. Чем отличается процесс радиационной блокировки клетки в поздней G_2-фазе от процесса блокировки в ранней G_2-фазе клеточного цикла?

4.4.4. Особенности функционирования контрольных точек

В клетках большинства опухолей некоторые или все контрольные точки цикла оказываются выключенными из-за генетических изменений, которые являются следствием злокачественной трансформации клеток. В последнее время активацию контрольных точек связывают с супрессорами опухолевого роста, функционирование которых нарушается при индукции пролиферации, происходящей под действием онкогенов.

Как считают, это происходит после активации онкогенов, индуцирующих «несвоевременную репликацию» и образование повреждений в ДНК. При нормальном функционировании контрольные точки блокируют дальнейшую пролиферацию таких клеток, и, следовательно, развитие опухоли активно подавляется. В пользу такой точки зрения свидетельствуют данные о том, что во многих случаях блокирование опухолевого роста, происходящее на ранних стадиях, связано с активацией контрольных точек.

Мутации в генах, кодирующих p53, BRCA1 или другие компоненты репарации ДНК, которые влияют на активацию контрольных точек, не позволяют остановить облученную клетку в цикле. Это может иметь важные последствия для возникновения генетической нестабильности после облучения и для развития опухолей, однако пока мало оснований предполагать, что в отсутствие функционирования контрольных точек изменяется радиочувствительность клеток. Так, хотя считается, что роль контрольных точек в фазах G_1/S, S и ранней G_2-фазе состоит в предоставлении клетке дополнительного времени для репарации повреждений, этот фактор, по-видимому, более важен для качества репарации, а не для ее объема.

Единственным исключением является контрольная точка в поздней G_2-фазе, активация которой в отличие от остальных точек зависит от ATR, а не от ATM. Существуют данные в пользу того, что она является

детерминантом радиочувствительности клеток. Например, ингибиторы ATR, инактивирующие эту точку, обладают радиосенсибилизирующими свойствами. Таким образом, по пока еще неизвестным причинам преждевременное вхождение в митоз клеток, находящихся в контрольной точке поздней G_2-фазы, приводит к увеличению их гибели.

Хотя контрольные точки в фазах G_1-/S, S и ранней G_2-фазе могут не оказывать влияния на радиочувствительность клеток после однократного облучения, они могут изменять ее при многократном (фракционированном) облучении. Существование контрольных точек в интактных клетках и их отсутствие в клетках многих опухолей влияет на клеточный состав популяции в определенные моменты времени после облучения и поэтому косвенным образом определяет ее чувствительность к повторному облучению.

Рассмотрим, например, две популяции одинаковых клеток, однако в одной популяции блок в контрольной точке G_1-фазы отсутствует. Через 24 ч после облучения клетки, в популяции которых эта точка отсутствует, могут оказаться в G_1-фазе в меньшем количестве, а в S-фазе – в большем по сравнению с популяцией, в которой эта контрольная точка интактна. Поскольку радиочувствительность клеток в фазах G_1 и S цикла различна, две популяции клеток могут по-разному реагировать на последующее облучение в этот момент времени. Поэтому все контрольные точки влияют на реакцию клеток на облучение, которое дается в режиме фракционирования дозы.

Наряду с лучевыми повреждениями, вызывающими гибель клеток, и вторичными морфологическими изменениями, связанными с клеточной летальностью, возникают морфологические повреждения, не приводящие к такому исходу. Например, пероксидация (перекисное окисление) мембранных липидов как следствие действия ионизирующей радиации – хорошо известный процесс. Мембранные дефекты могут стабильно поддерживаться клеткой, так как система репарации мембран использует в качестве затравки уже имеющиеся структуры. Структурная наследственность впервые была продемонстрирована в работах Т. Сонеборна на Parameciumaurelia, а затем и на других инфузориях. Как предположил А.М. Оловников, мембранная память может быть одной из причин ускоренного радиационного старения.

Реакция клеток на лучевые морфологические повреждения в настоящее время изучена недостаточно. Известно, что у дрожжей Saccharomycescerevisiae остановку клеточного цикла могут вызывать нарушения прохождения клеточного цикла, не связанные с повреждением ДНК.

Иными словами, существуют контрольные точки целостности клеточных структур, т.е. обнаружен «чекпойнт»-контроль не только репликации и митоза, но и цитокинеза. Более того, ионизирующие излучения

наряду с индукцией «чекпойнт»-генов, генов репарации ДНК и окислительного стресса вызывают также индукцию генов, участвующих в построении клеточной стенки. Радиация индуцирует обратимую деполяризацию митохондриального потенциала (AW), вызывающую выход АФК из митохондрий в цитоплазму.

Показано, что ингибиторы, блокирующие этот процесс, препятствуют также образованию сигнала киназного каскада «чекпойнта». Сенсором АФК является актиновый цитоскелет. В ответ на окислительный стресс в актине образуется дисульфидная связь между двумя цистеинами Cys285 и Cys374. Окисление и гиперстабилизация актина в дальнейшем служит апоптотическим сигналом, связанным с накоплением АФК.

Можно предположить, что в реакции клеток на воздействие ионизирующей радиации задействованы морфологические контрольные точки, «сканирующие» целостность клеточных структур, при нарушении которой происходит остановка клеточного деления с последующими восстановительными процессами. Их запуск, или активация программируемой гибели клеток, регулируется морфологическим «чекпойнтом», имеющим общие этапы с механизмами регуляции «чекпойнт»-контроля повреждений ДНК. Киназа Cdk1/Cdc28 – главный регулятор прохождения клеточного цикла – служит мишенью не только «чекпойнт»-контроля повреждений ДНК, но также «чекпойнт»-контроля морфологии и цитокинеза.

У дрожжей был обнаружен цитоплазматический «чекпойнт», контролирующий положение ядра. В остановке деления перед анафазой можно выделить предположительно два компонента: подавление расхождения хромосом (Pdsl) и предотвращение динеин-зависимого движения веретена в почку, которое происходит в норме в анафазе. Взаимодействие пула веретена с кортексом почки активирует систему выхода из митоза MEN, включающую фосфатазу Cdcl4, которая запускает телофазу и вступление в следующий цикл деления клетки.

Продемонстрировано участие MEN в «чекпойнт»-контроле наследования митохондрий. В клетках mdm10Д наблюдается дефект высвобождения из ядрышка центрального игрока MEN фосфатазы Cdcl4, что влияет на его способность активировать субстраты в перешейке почки и SPB.

Контрольные вопросы

1. Каким образом, согласно современным научным взглядам, происходит активация контрольных точек?
2. Какая контрольная тока и почему считается детерминантом радиочувствительности клеток?
3. Какова роль цитоплазматического «чекпойнта» при воздействии ионизирующей радиации?

Глава 5

ТИПЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ И МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАЕМОСТИ

5.1. Ранняя реакция на повреждение

Понятие радиационной гибели клеток к настоящему времени объединяет явления интерфазной и репродуктивной их гибели с двумя типами клеточного танатогенеза – апоптозом и некрозом. Способность кроветворных стволовых клеток к элиминации радиационного повреждения, к выживанию и репопуляции через пролиферацию и дифференцировку – важное условие выживаемости (радиорезистентности) организмов млекопитающих после облучения в среднесмертельных дозах. Напротив, генетически обусловленная неспособность клеток в определенном состоянии к устранению значительной части радиационных повреждений, приводящая к их гибели, составляет основу радиочувствительности организма.

Как будет видно далее, все вышеназванные радиобиологические эффекты и явления – нарушение продвижения клеток по циклу, их репродуктивная гибель, апоптоз и некроз, возникновение мутантных клонов, опухолевая трансформация, метаболические феномены, причастные к формированию состояний радиорезистентности и радиочувствительности организма, – имеют молекулярно-биохимическую основу.

В последние годы стала очевидной взаимосвязь и ключевая роль процессов регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптоза в формировании радиобиологического эффекта на уровне критических органов и организма в целом.

Феномен характерен только для пролиферирующих клеток и проявляется немедленной остановкой продвижения клеток по циклу в любой из его фаз сразу после облучения. Сверочные точки представляют собой механизм на переходе клеток из одной фазы цикла в другую, который выявляет повреждения в ДНК, реагирует на это соответствующим сигналом. Механизм сверочных точек индуцирует транскрипцию генов, контролирующих образование белковых факторов, необходимых для устранения выявленного дефекта в структуре ДНК путем ее репарации. Он контролируется геном Tp53 с помощью кодируемого им белка с тем же названием.

Опухолевый супрессор белок Тр53 – «страж генома». Опухолевый супрессор белок Тр53 (tumor suppressorprotein 53, т.е. белок молекулярной массой 53 кДа) – обязательный компонент каждой пролиферирующей клетки. Он является важным, если не главным, в координации адаптивных реакций клеток на различные повреждающие воздействия, инициатором выявления с помощью сверочных точек генетически дефектных клеток, активации их репарации или уничтожения путем апоптоза. Опухолевым супрессором он называется как раз из-за способности таким путем предотвращать опухолевое перерождение тканей.

В норме после синтеза в цитоплазме клетки ядерный белок Тр53 образует тетрамер, который перемещается в ядро и вступает в коплекс с другим белком – MDM2. После этого белок Тр53 сразу же подвергается химической модификации путем убиквитинилирования и немедленно становится объектом деградации в протеасоме S26, расположенной вблизи ядерной мембраны. В результате полупериод жизни белка Тр53 в норме составляет около 20 мин, а содержание его в клетках определяется как «следы».

Считается, что в интактной клетке функционально он себя не проявляет. При радиационном повреждении ДНК в дозах, вызывающих образование хотя бы одного двунитевого разрыва, другой белок – ATM (продукт гена ATM– ataxiatelangiectasia-mutated, мутация которого лежит в основе болезни атаксия-телеангиэктазия человека) – выступает молекулярным сенсором такого повреждения. Имея сродство к двунитевым разрывам ДНК и свойства протеинкиназы для белков MDM2 и Тр53, ATM при связывании с ДНК в месте разрыва переходит в активное состояние и подвергает эти белки фосфорилированию. Фосфорильные группы в MDM2 и Тр53 создают стерические препятствия для образования их комплекса друг с другом, и Тр53 после дальнейшего фосфорилирования и ацетилирования переходит в стабильное состояние. Время его полужизни в клетке возрастает многократно – до 2 ч, а содержание – в 20 раз.

Имея способность взаимодействовать с другими белками и, что особенно важно, с различными участками хромосомной ДНК, белок Тр53 переводит регуляторные элементы многих генов в активное состояние – вызывает трансактивацию (активацию транскрипции) ДНК. Главные из активируемых генов – *MDM2* (его продукт – негативный регулятор функции белка Тр53), *p21* – ингибитор циклин-зависимой киназы, ответственный за остановку клеточного цикла на переходе G_1/S, а также *CADD45* (growtharrestandDNAdamage, остановки клеточного роста при повреждении ДНК) и *14-3-3σ*, контролирующие синтез ДНК, ее репарацию, продвижение клеток по циклу, ингибирование циклина B.

Под действием белковых продуктов этих генов возникают блоки G_1/S и G_2/M, синтез ДНК и переход клеток к митотическому делению приостанавливаются, а активация репарации ДНК обеспечивает устранение радиационно-индуцированных повреждений, снимая риск удвоения дефектов в геноме дочерних клеток. При этом блок на границе G_2/M-клеточного цикла обеспечивается той частью внутриклеточной сети проведения регуляторных сигналов, которая получила название MKK6-p38γ-каскада, известного как ERK6 или SAPK3, связанного с активацией гена *ATM*. Общее время от начала задержки клеток в G_1-, S- или G_2-периоде до включения команды на апоптоз (условие для репарации ДНК от повреждений) является детерминантой радиочувствительности линий кроветворных клеток человека. Мутации в гене *Тр53* предотвращают индукцию апоптоза и делают эти клетки более радиорезистентными.

Важность биологической роли белка Тр53 в клетке одним из первых весьма точно в 1992 г. охарактеризовал Лейн, который назвал этот белок «страж генома» (рис. 5.1).

В отсутствие повреждающих воздействий (рис. 5.1, *а*) интактная клетка в ходе нормального деления дает нормальное потомство. При радиационном повреждении ДНК (рис. 5.1, *б*) происходит стабилизация белка Тр53 и рост его содержания, что приводит к G_1- и C_2-блокам клеточного цикла и прекращению клеточного деления.

В ходе репарации структура ДНК восстанавливается, блокада клеточного цикла прекращается и клетка делится, давая нормальное потомство. Если же репарация ДНК из-за характера повреждения не завершается, тот же белок Тр53 формирует команду на уничтожение клетки путем апоптоза. Так реализуется функция белка p53 в поддержании постоянства генома в качестве его «охранника».

При утрате этой функции (повреждение гена *Тр53* и образование мутантного белка Тр53) возникает третий вариант: клеточный цикл с поврежденной ДНК протекает беспрепятственно, но дефект сказывается в митозе, и тогда клетка либо погибает, либо дает потомство с утратой части генетического материала, мутационными изменениями и нестабильностью генома (рис. 5.1, *в*).

Промотирующее воздействие радиации на такие клетки с дефектной функцией белка Тр53 в качестве «стража генома» (рис. 5.1, *г*) вызывает усиленную продукцию активных форм кислорода, активацию генов антиапоптотического подсемейства белков bcl-2, ряд других эффектов, что, по мнению многих исследователей, завершается опухолевой трансформацией. Такому развитию событий призваны противостоять молекулярные механизмы апоптоза.

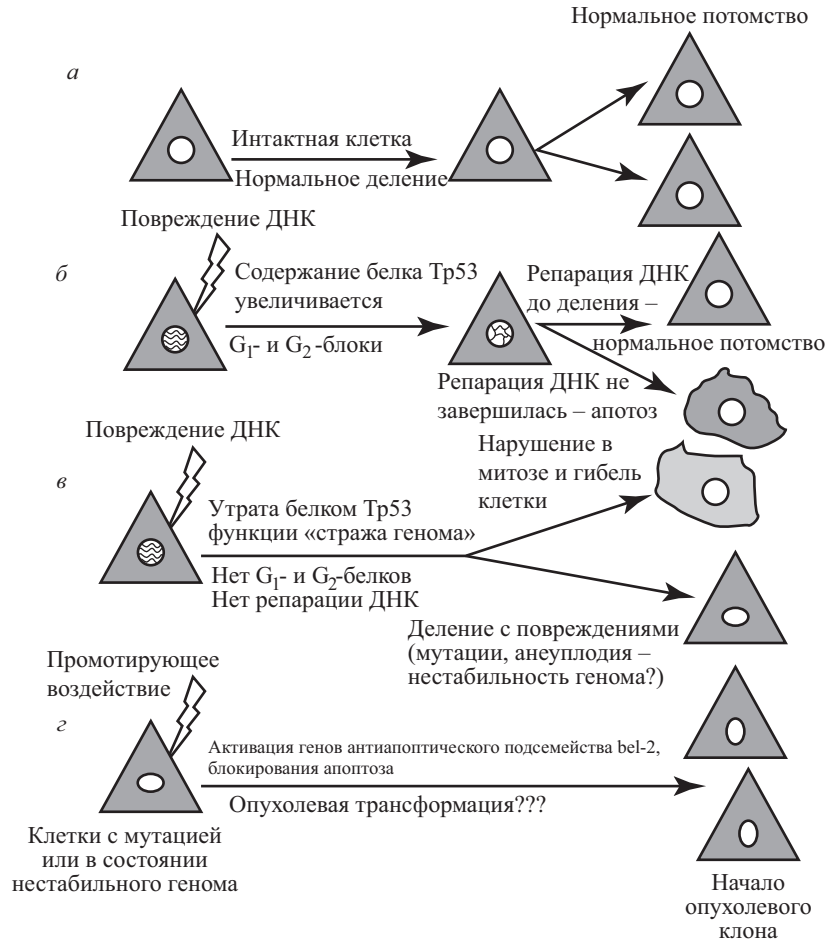

Рис. 5.1. Функция белка и гена Тр53 в качестве «стража генома» и возможность опухолевой трансформации клеток в случае утраты этой функции в результате соматической мутации

Контрольные вопросы

1. Какую роль играет ядерный белок Тр53 в нормальной клетке?
2. Какие изменения происходят с Тр53 при радиационном повреждении ДНК?
3. Что происходит в клетке при повреждение гена р53?

5.2. Репродуктивная гибель

Клеточный цикл, являющийся универсальным звеном в цепи событий клеточного воспроизводства, условно подразделяют на две фазы – интерфазу, во время которой клетка растет и готовится к воспроизводству, и митоз, во время которого ядро, а затем остальная часть клетки делятся. Отсюда название двух типов радиационно-обусловленной клеточной гибели – интерфазная и митотическая (репродуктивная).

Репродуктивную гибель от интерфазной отличают:

- связь с процессом клеточного деления, т.е. преобладание клеточной гибели в делящихся клеточных популяциях;
- иная зависимость проявления от времени: максимум не в первые часы после облучения, а в более поздний период (в костном мозге у крыс не ранее чем через 10 ч, в среднем через 16–20 ч после облучения);
- сигмоидальный характер дозовой зависимости в отличие от двухкомпонентной при интерфазной, причем каждая из компонент может быть аппроксимирована прямой линией;
- возможность изменить время появления мертвых клеток изменением времени вступления клеточной популяции в митоз;
- тесная связь с появлением хромосомных аберраций, которые элиминируются из ткани вместе с клетками, гибнущими при вступлении в митоз.

Наиболее вероятной причиной репродуктивной гибели клеток считается повреждение их ДНК в ходе ее репликации во вторую половину S-периода. Количественная оценка соотношения выраженности интерфазной и репродуктивной гибели клеток в отдельных тканях после облучения произведена лишь частично: в лимфоидной ткани преобладает интерфазная гибель клеток, в костном мозге – репродуктивная, хотя доля интерфазы гибнущих клеток весьма значительна.

Известно, что нарушение структуры ДНК в виде однонитевых и двунитевых разрывов является причиной сублетальных, потенциально летальных и летальных повреждений клетки. Двунитевой разрыв, нарушая суперспираль ядерной ДНК, приводит к летальной аберрации хромосом – асимметричному хромосомному обмену и делеции, которая и обусловливает репродуктивную гибель клеток.

Следовательно, несостоятельность или неэффективность репарации ДНК от двунитевых разрывов, являясь ключевым звеном молекулярного механизма репродуктивной гибели клеток, создает молекулярную основу клеточного опустошения радиочувствительных органов. Обеспечение условий повышения эффективности репарации ДНК от двунитевых разрывов может быть одним из путей понижения радиационного эффекта на тканевом и соответственно организменном уровнях.

При этом очевидно, что репродуктивная гибель клеток с молекулярными дефектами в наследственном материале после воздействия ионизирующей радиации по своей физиологической сути не является событием патологическим, а составляет часть нормального биологического механизма поддержания постоянства генома. Суть этого механизма состоит в репарации поврежденной ДНК, а при невозможности ее полного восстановления – в элиминации дефектных клеток посредством феномена гибели. И только масштабы его проявления, зависимые от дозы облучения, указывают на то, что этот нормальный механизм используется для преодоления потенциальной патологии в популяциях пролиферирующих клеток организма.

Контрольные вопросы

1. Чем отличается репродуктивная гибель клетки от интерфазной?
2. Каковы последствия для клетки однонитиевых и двунитиевых разрывов ДНК?
3. Какое условие может стать одним из путей понижения радиационного эффекта на тканевом и организменном уровнях?

5.3. Определение понятия апоптоза. Признаки апоптоза

Апоптоз (от греч. apo – отделение и ptosis – падение) – это запрограммированный процесс уничтожения клетки, вызванный внутренними (внутриклеточными) или внешними (внеклеточными) как физиологическими, так и патологическими факторами, активирующими генетическую программу гибели клетки и ее удаление из ткани.

Анализируя это определение, можно сделать несколько выводов:

• во-первых, процесс гибели клетки запрограммирован в ее генетическом аппарате. Иначе говоря, клетка при рождении уже несет в себе механизмы своей гибели, т.е. в геноме клетки содержатся гены, активация которых запускает механизм ее гибели;

• во-вторых, апоптоз может инициироваться как при протекании нормальных физиологических процессов, так и при развитии определенной патологии;

• в-третьих, механизм клеточной гибели может запускаться как факторами, образующимися в самой клетке (т.е. внутриклеточными факторами), так и сигналами, переданными клетке от других клеток.

Ученые, присвоившие феномену программированной клеточной гибели термин «апоптоз», имели в виду некий художественный образ: осеннее опадание листвы. Именно так, обреченно и спокойно деревья

осенью теряют свою листву. Действительно, отделение черенка листа от древесной ветки происходит благодаря апоптозу слоя растительных клеток. Так невольно художественный образ совпал с существом физиологического процесса.

Феномен апоптоза – программированной клеточной гибели – описан исследователями значительно позднее, чем это было сделано по отношению к некрозу.

Так, Р. Вирхов еще в 1859 г. описал гистологические изменения, которые происходят в гибнущих клетках. Речь при этом шла о процессе, который Вирхов назвал дегенерацией, некрозом, умиранием клеток и подчеркнул, что указанные изменения характерны для необратимых изменений в тканях.

Однако вскоре после этого в 1864 г. известный зоолог и теоретик эволюционного учения А. Вейсман впервые описал локальную гибель клеток при метаморфозе у насекомых (превращение личинки во взрослую особь). С современной точки зрения это описание соответствует эмбриональному апоптозу.

Позднее детальное описание смерти клеток как физиологического явления было дано в 1885 г. немецким цитологом В. Флемингом, который описал распад клеток овариального эпителия на частицы (впоследствии названные апоптозными тельцами), определив процесс быстрого исчезновения образовавшихся при распаде клеток фрагментов цитоплазмы и ядра как хроматолизис.

Физиологическую смерть клеток у эмбрионов в 1950 г. детально описал Л. Глусман, назвав ее «программированная клеточная гибель». Этот исследователь отчетливо понимал, что имеет дело с особым видом клеточной смерти, но посчитал, что данное явление присуще только эмбриогенезу и принципиально отличается от клеточной гибели, характерной для взрослого организма.

Большинство работ, связанных с описанием апоптоза опухолевых клеток, клеток иммунной системы и некоторых других тканей, относится к концу прошлого века. Сам термин «апоптоз» был впервые применен в статье трех исследователей J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, опубликовавших в журнале British J. of Cancer материалы о программированной гибели клеток опухоли.

Значимость апоптоза и его роль в физиологических и патологических процессах была подтверждена присуждением в 2002 г. Нобелевской премии трем исследователям – С. Бреннеру (S. Brenner), Дж. Салстону (J. Sulston) и Р. Хорвицу (R. Horvitz) за циклы работ, посвященных проблеме программированной клеточной гибели. В частности, Бреннер еще в 60-е гг. прошлого века обнаружил гены, управляющие «жизнью

и смертью» клеток органов в процессе их развития. Салстон впервые обнаружил и описал мутации в генах апоптоза, а Хорвиц – механизмы взаимосвязи между генами, вовлеченными в процесс апоптоза.

В настоящее время биологи и патологи выделяют два вида клеточной гибели: некроз и апоптоз. Для того чтобы последовательно и внимательно разобраться с механизмами апоптоза, необходимо хотя бы вкратце описать морфологические и биохимические различия этих двух процессов.

Самым ранним признаком апоптоза, выявляемом на электронно-микроскопическом уровне, являются резко очерченные уплотнения ядерного хроматина в виде гомогенной массы. Кроме того, наблюдается некоторая конденсация (уплотнение) цитоплазмы. Затем ядро и цитоплазма распадаются на фрагменты, причем цитоплазматические фрагменты разделяются цитоплазматической мембраной, т.е. сохранность мембраны в данном случае является одним из признаков апоптоза.

В результате апоптоза клетка превращается в совокупность окруженных мембраной апоптозных телец, в которых плотно упакованные органеллы могут выглядеть интактными. В некоторых таких тельцах нет ядерного компонента, а в других – есть (иногда даже несколько), причем хроматин всегда очень плотный, резко очерчен и сконденсирован у ядерной мембраны.

Апоптозные тельца быстро поглощаются соседними клетками, где утилизируются с помощью лизосом. Окружающие клетки при этом сближаются, так что изменений цитоархитектоники тканей не происходит. Также полностью отсутствуют признаки воспаления. Некоторые апоптозные тельца (например, в поверхностном эпителии) слущиваются.

В культуре тканей было установлено, что процесс конденсации цитоплазмы и ее распада на апоптозные тельца происходит в течение нескольких минут. В организме процесс апоптоза также происходит достаточно быстро: фагоцитоз и утилизация апоптозных телец протекают в течение 15–120 мин, в связи с чем процесс апоптоза исследователи часто не могут уловить.

Ультраструктурные проявления некроза значительно отличаются от характерной для апоптоза картины. Главным образом они сводятся к сморщиванию органелл и дезинтеграции цитоплазмы. Хоть хроматин в некротизирующихся клетках так же, как и при апоптозе, конденсируется у ядерной мембраны, его компактные массы менее однородны и значительно менее четко очерчены по краям ядра. После образования этих масс (или даже параллельно с этим процессом) происходит разрушение клеточных и внутриклеточных мембран, в том числе и мембран лизосом, что приводит к высвобождению лизосомальных энзимов, протеолизу и распаду клетки. На более поздней стадии некроза хроматин из ядра исчезает, т.е. развивается кариолизис. Некроз обычно сопровождается экссудативным воспалением и, если в процесс вовлечено большое количество клеток, заканчивается образованием рубца. Другими словами, в отличие от апоптоза при некрозе восстановления цитоархитектоники ткани не происходит.

Контрольные вопросы

1. Какой процесс получил название «апоптоз»?
2. Какие выводы можно сделать, анализируя термин «апоптоз»?
3. Какие ученые внесли значительный вклад в изучение апоптоза? В чем состояла суть их работ?
4. Как происходит процесс апоптоза?
5. Чем ультраструктурные проявления некроза отличаются от характерной для апоптоза картины?

5.3.1. Причины апоптоза

Как отмечалорь ранее, смерть клеток в организме может происходить путями некроза и апоптоза.

Апоптоз – это такой тип гибели клеток, при котором сама клетка активно участвует в процессе своей гибели, т.е. происходит самоуничтожение клетки. Апоптоз в отличие от некроза является процессом активным, после воздействия этиологических факторов запускается генетически запрограммированный каскад реакций, сопровождающийся активацией определенных генов, синтезом белков, ферментов, приводящих к эффективному и быстрому удалению клетки из ткани.

Такое явление является результатом действия различных факторов, приводящих к гибели клетки. Это могут быть неспецифические факторы: температура, токсические агенты, оксиданты, свободные радикалы, γ- и УФ-излучения, бактериальные токсины и др. Во всех этих случаях происходит индукция апоптоза, но при увеличении дозы соответствующего агента развивается некроз клетки.

Поскольку апоптоз – физиологическое явление, то в организме должны быть факторы, приводящие к программируемой клеточной гибели. В настоящее время известно, что таковыми могут быть как внутриклеточные, так и внешние сигналы, опосредующие свое действие через рецепторные системы, которые сами по себе не являются токсическими или деструктивными.

Среди физиологических явлений наибольший интерес вызывают гормоны. Известно, что они могут выступать как индукторами, так и ингибиторами гибели клетки в зависимости от стадии ее дифференцировки (например, половые гормоны). Центральное место в исследовании

апоптогенного действия гормонов принадлежит изучению влияния глюкокортикоидов (ГК) на лимфоидные клетки. Чувствительность Т-клеток к ГК зависит от стадии развития лимфоцитов. Пре-Т-клетки костного мозга и незрелые Т-клетки тимуса чувствительны к физиологическим дозам ГК. Определенные субпопуляции зрелых Т-лимфоцитов (натуральные киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты) претерпевают апоптоз под действием ГК. Также гибнут пре-В-клетки и незрелые В-клетки. Зрелые В-лимфоциты не чувствительны к ГК.

Другим физиологическим регулятором КГ являются цитокины (обширная группа белков, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток при связывании со специфическими рецепторами на клетках-мишенях). Цитокины подразделяются на три большие группы (в зависимости от структуры и функции): ростовые факторы, семейство фактора некроза опухоли и спиральные цитокины (интерлейкины, интерфероны). Эффект цитокинов на клетки также неоднозначен: для одних клеток они выступают в роли индуктора, для других – в роли ингибитора апоптоза. Это зависит от типа клетки, стадии ее дифференцировки и фукционального состояния. Наличие в организме физиологических факторов – индукторов и ингибиторов апоптоза – позволяет сделать вывод, что программируемая гибель клеток зависит от соотношения этих регуляторов.

Итак:

- во время эмбриогенеза апоптоз играет важную роль в разрушении различных тканевых зачатков и формировании органов;
- апоптозу подвергаются стареющие клетки, закончившие цикл своего развития, например клетки, исчерпавшие запас цитокинов, – лимфоциты;
- в растущих тканях определенная часть дочерних клеток подвергается апоптозу;
- процент погибающих клеток может регулироваться системными и местными гормонами;
- причиной апоптоза может быть слабое воздействие повреждающих факторов, которые при большей интенсивности могут привести к некрозу (гипоксия, ионизирующее излучение, токсины и др.).

Контрольные вопросы

1. Действия каких факторов могут привести к гибели клетки?
2. Какой гормон занимает центральное место в исследовании апоптогенного действия? На какие клетки изучается действие этого гормона?
3. На какие группы подразделяются цитокины? Какой эффект они оказывают на клетки?
4. От чего зависит программируемая гибель клеток?

5.3.2. Участие апоптоза в физиологических и патологических процессах

Апоптоз – это один из фундаментальных процессов в жизни клеток организмов, находящихся на самом различном уровне эволюционного развития. Достаточно указать, что основные работы, связанные с генетикой апоптоза, были выполнены на круглых червях – нематодах.

При этом было установлено, что гены, управляющие апоптозом (стимулирующие апоптоз и тормозящие этот процесс) у нематод и человека мало чем отличаются друг от друга. Именно поэтому физиологические процессы, в обеспечении которых принимает участи апоптоз, сходны для большинства живых организмов.

При описании каких же физиологических процессов мы сталкиваемся с явлением апоптоза? Прежде всего это автономный апоптоз, протекающий в процессе эмбриогенеза. Различают три категории автономного эмбрионального апоптоза: морфогенетический, гистогенетический и филогенетический. За счет морфогенетического апоптоза разрушаются различные, не нужные формирующемуся организму тканевые зачатки (например, разрушение клеток в межпальцевых промежутках). Гистогенетический апоптоз способствует дифференцировке органов и тканей. Этот вид апоптоза, в частности, сопровождает дифференцировку половых органов из тканевых зачатков (например, регрессию у мужчин зачатков протоков Мюллера, из которых у женщин формируются маточные трубы, матка и верхняя часть влагалища). Филогенетический апоптоз вызывает ликвидацию рудиментарных органов и структур у эмбриона (например, инволюцию пронефроса – «предпочки», парного выделительного органа у низших позвоночных, который не развивается у высших позвоночных).

Физиологическим является и апоптоз, протекающий в медленно- и быстропролиферирующих клеточных популяциях.

В первом случае речь идет о поддержании тканевого гомеостаза, удалении из ткани клеток, не способных к митозу в силу своего старения, и «освобождении места» в ткани для молодых, активно делящихся клеток. Во втором случае – об обеспечении дифференцировки и развития клеточных элементов быстро пролиферирующих клеточных популяций (например, кроветворной ткани).

К участию апоптоза в физиологических процессах можно отнести и так называемую гормон-зависимую инволюцию органов и тканей. Примером этого процесса может служить отторжение эндометрия во время менструального цикла и регрессия молочной железы у женщины после прекращения кормления ребенка грудью.

Чрезвычайно велика роль апоптоза и в целом ряде патологических процессов. Не останавливаясь на деталях этих процессов, следует указать, что апоптоз характерен для следующих патологических процессов, в которых он может играть как сано-, так и патогенетическую роль:

• апоптоз клеток, имеющих повреждение ДНК. Чаще всего мы сталкиваемся с повреждениями ДНК, обусловленными жесткой радиацией или длительным воздействием ультрафиолетового излучения. В том случае, если репаразные системы клетки не способны «залечить» поврежденную ДНК, включаются гены, ответственные за инициацию апоптоза, и клетка гибнет. Таким образом, апоптоз предупреждает возможность появления клона клеток-мутантов, что всегда грозит тяжелыми последствиями для организма;

• апоптоз опухолевых клеток. В определенной степени это частный случай апоптоза предыдущего вида. Приобретение клетками свойства безудержного размножения без явления созревания в результате воздействия на геном клетки вирусных онкобелков, канцерогенов или той же радиации может привести к появлению клона малегнизированных клеток, что чревато развитием злокачественных опухолей;

• апоптоз клеток ишемизированных органов и тканей. Ишемия органов и тканей может приводить к развитию как некроза, так апоптоза. В первом случае в ткани будет образовываться рубец, во втором случае рубца не будет, но количество нормально функционирующих клеток будет уменьшаться. Явления апоптоза отчетливо регистрируются в периинфарктной зоне при инфаркте миокарда, апоптоз «виновен» в гибели кардиомиоцитов на заключительных стадиях развития сердечной недостаточности;

• атрофия гормон-зависимых органов в результате апоптоза при недостатке (отсутствии) соответствующего регулирующего гормона. В патологии эндокринной системы хорошо известен так называемый синдром отмены – тяжелая патология, связанная с гибелью клеток и, как следствие, прекращением выработки кортикостероидов надпочечниками при отмене длительной терапии кортикоидными препаратами некоторых патологических процессов. Другим примером этого процесса может служить атрофия предстательной железы после кастрации;

• апоптоз клеток, находящихся в состоянии «клеточного стресса». Перегревание клеток, воздействие на клетки активных форм кислорода (кислородных радикалов), по интенсивности не способное вызвать некроз, может приводить к инициированию апоптоза;

• апоптоз клеток, зараженных вирусами. Это очень важная защитная функция организма. Гибель зараженной вирусом клетки препятствует, с одной стороны, циклу его размножения, а с другой – малегнизации ткани за счет появления быстропролиферирующего клона клеток, мутировавших под действием вирусных онкобелков. Следует указать, что некоторые вирусы (например, вирус Эпштейна – Барра), проникая в клетку, способны синтезировать белки, препятствующие апоптозу. Вместе с тем некоторые вирусы (например, вирус СПИДа) способны вызывать апоптоз Т-хелперов и тем самым приводить к развитию иммунодефицита;

• апоптоз клеток «хозяина», индуцированный цитотоксическими Т-лимфоцитами при трансплантации иммунокомпетентной ткани. В иммунологии хорошо известна реакция «трансплантат против хозяин». При пересадке иммунокомпетентной ткани (например, костного мозга) иммунные клетки трансплантата способны уничтожать клетки реципиента. При этом уничтожение клеток идет за счет как повреждения клеток протеолитическими ферментами Т-киллеров, так и индукции в клетках «хозяина» апоптоза.

Контрольные вопросы

1. Почему физиологические процессы, в обеспечении которых принимает участие апоптоз, сходны для большинства живых организмов?
2. Как можно охарактеризовать три категории автономного эмбрионального апоптоза?
3. Как можно охарактеризовать патологические процессы, в которых апоптоз играет как сано-, так и патогенетическую роль.

5.3.3. Роль усиления или ослабления апоптоза в развитии патологических процессов

Как усиление, так и ослабление апоптоза может играть едва ли не решающую роль в развитии многих патологических процессов. Ненормальное усиление апоптоза в процессе развития плода может приводить к эффекту «минус ткань», что весьма часто не совместимо с жизнью и заканчивается внутриутробной гибелью плода.

Повышенный апоптоз кардиомиоцитов при болезни Дауна способен привести к развитию кардиомиопатии.

Многие виды патологии системы крови также объясняются повышением уровня апоптоза кроветворных клеток-предшественниц. В результате возникают такие заболевания, как тяжелые комбинированные иммунодефициты, апластические анемии, панцитопении. Чаще всего эта патология является следствием недостаточной выработки так называемых факторов выживания, например интерлейкина 7 (ИЛ-7), который является цитокином, тормозящим апоптоз стволовых и других клеток-предшественниц.

Усиление апоптоза играет ведущую роль в развитии нейродегенеративных процессов (болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и др.).

Усиление апоптоза Т-хелперов при СПИДе является основным патогенетическим механизмом этого иммунодефицита. И в тоже время усиление апоптоза клеток, инфицированных вирусами или поврежденных микробными токсинами, играет положительную роль, прерывая прогрессирование вирусных и микробных инфекций.

Цитотоксическая терапия (применение цитостатиков и радиационная терапия), вызывая повреждение ДНК малегнизированных клеток, с одной стороны, блокирует их митотический цикл, а с другой – индуцирует апоптоз.

Ослабление апоптоза также может способствовать развитию патологических процессов. Прежде всего это положение хорошо демонстрирует явление ослабления апоптоза при онкологических заболеваниях. Наиболее активными, стремительно развивающимися являются злокачественные опухоли, при развитии которых в силу их особенностей апоптоз опухолевых клеток угнетен. При развитии опухоли происходит как бы соревнование двух процессов: развитие апоптоза и размножение клеток опухоли. Если степень апоптоза малегнизированных клеток высока, их клон не образуется и опухоль не развивается. Если же темпы размножения опухолевых клеток обгоняют апоптоз, в организме возникает злокачественное новообразование.

Повышенная продукция в клетках иммунной системы факторов, тормозящих апоптоз, а также образование внеклеточных факторов, блокирующих апоптоз (например, появление растворимых рецепторов некоторых цитокинов, способных индуцировать апоптоз), может приводить к развитию ряда аутоиммунных процессов вплоть до проявления системной аутоиммунной патологии (например, системной красной волчанки).

Контрольные вопросы

1. К какому эффекту может привести ненормальное усиление апоптоза в процессе развития плода?
2. К каким патологиям у человека может привести усиление апоптоза?
3. Развитию каких патологических процессов может способствовать ослабление апоптоза?

5.3.4. Про- и антиапоптозные клеточные факторы

Мы уже убедились, что на протекание ряда патологических процессов в организме может оказывать кардинальное влияние как ускорение, так и замедление апоптоза. Вещества, участвующие в регуляции апоптоза, как правило, являются белками, а их синтез контролируется соответствующими генами.

Одинаковые гены, регулирующие уровень апоптоза, можно обнаружить у живых существ, стоящих на самых различных ступенях эволюции. К числу генов, ингибирующих апоптоз, относятся гены Bcl-2, Ced-9, BHRF1, MCL-1. Также были описаны гены, синтезирующие белки, стимулирующие апоптоз (p53, Bax, bcl-xS). Следует иметь в виду, что проантиапоптозные белки способны объединяться друг с другом, формируя гомо- и гетеродимеры. Например, при объединении ингибитора апоптоза белка Bcl-2 с белком – активатором апоптоза Bax – итог (торможение или активация апоптоза) будет определяться тем, какой белок будет преобладать в этом объединении.

В дальнейшем для большей наглядности и некоторого упрощения рассматриваемых механизмов и схем апоптоза в качестве фактора, стимулирующего апоптоз, будет указываться только белок p53, а в качестве основного фактора, тормозящего апоптоз, – белок Bcl-2.

Ранее уже упоминалось о том, что апоптоз индуцируется в клетках, имеющих нерепарированное повреждение ДНК. В этом случае уничтожение клетки предупреждает появление клонов клеток-мутантов, существование которых может привести к весьма тяжелым последствиям (например, к развитию злокачественной опухоли).

Нерепарированное повреждение ДНК (рис. 5.2) приводит к активации двух генов: p21 и p53. Выработка белка p21 одноименным геном обеспечивает блокаду митотического цикла (клетка-мутант не должна производить себе подобные клетки-мутанты).

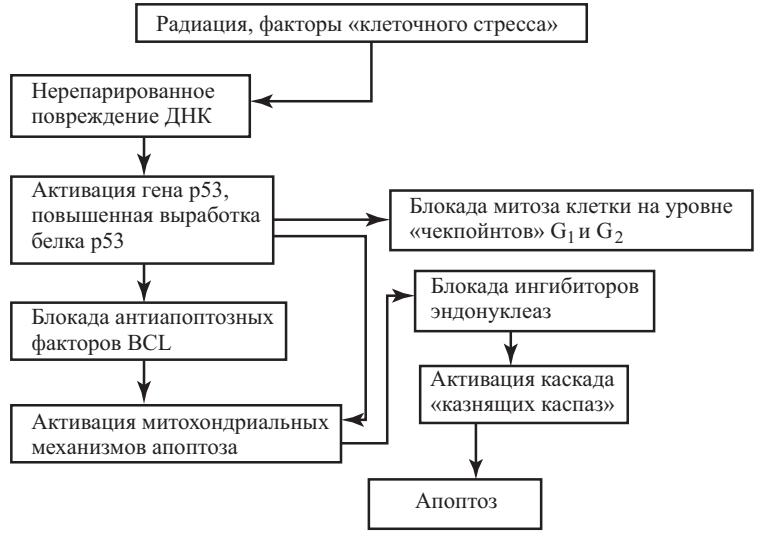

Рис. 5.2. Механизм апоптоза, индуцированного внутриклеточными факторами

Напомним, что клеточный (митотический) цикл начинается с фазы G_1 – подготовки к синтезу ДНК. За ней следуют фазы S – фаза синтеза ДНК и фаза G_2 – постсинтетическая. Завершается цикл митозом клетки.

Весьма важными являются и еще два момента в жизни клетки, вошедшей в митотический цикл. Это так называемые контрольные пункты (checkpoints): на границе фазы G_1/S и на границе фазы G_2/митоз. На уровне контрольных пунктов проверяется целостность ДНК, отсутствие ее мутаций и делеций. У клеток, имеющих поврежденную ДНК, клеточный цикл блокируется, и клетка вступает в стадию апоптоза.

Активация гена p53 и синтез одноименного белка запускают механизм апоптоза. При этом белок p53, с одной стороны, блокирует антиапоптозные механизмы белка Bcl-2, встроенного в мембраны митохондрий, а с другой стороны – обеспечивает раскрытие пор митохондрий и выход в протоплазму клетки веществ, являющихся активаторами внутриклеточных протеаз – так называемых казнящих каспаз (более подробно о митохондриальном механизме апоптоза и о роли каспаз в этом процессе будет рассказано в дальнейшем).

Активные каспазы вызывают протеолиз ядерных белков, активируют эндонуклеазы и обеспечивают протеолиз цитоплазматических белков. В конечном счете это приводит к фрагментации ядра клетки, цитоплазмы и образованию апоптозных телец. Апоптоз завершен.

Контрольные вопросы

1. Какие гены и белки регулируют уровень апоптоза у живых существ, стоящих на самых различных ступенях эволюции?
2. Какие существуют фазы клеточного цикла?
3. Где находятся контрольные точки клеточного цикла и какова их роль?
4. Какую можно начертить схему механизма апоптоза, индуцированного внутриклеточными факторами?

5.3.5. «Инструктивный» апоптоз

Процесс апоптоза может инициироваться и внешними сигналами, которые одна клетка передает другой. Роль сигнальных молекул в этом случае играют некоторые цитокины (факторы некроза опухолей – ФНО-α, ФНО-β, он же лимфотоксин, а также фактор роста нервов и некоторые другие).

Значение этого вида апоптоза, который получил название «инструктивный», весьма велико для нормальной деятельности прежде всего иммунной системы (противоопухолевый иммунитет, защита естественных антигенов, например, семенников или хрусталика глаза от иммуноцитов организма и т.п.).

Схема развития «инструктивного» апоптоза представлена на рис. 5.3.

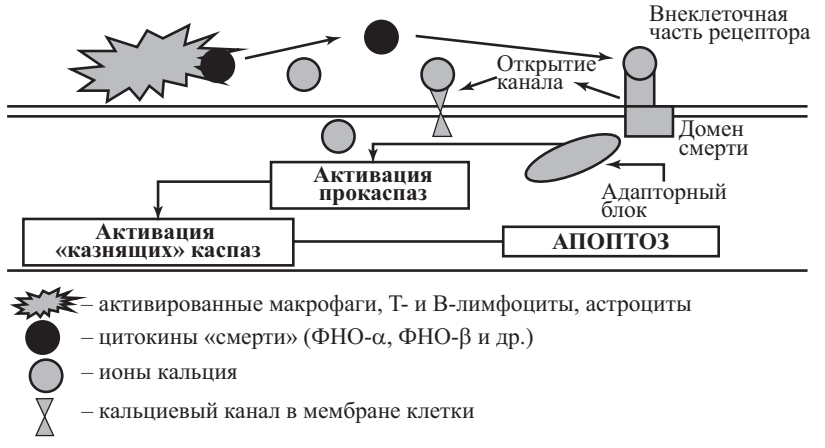

Рис. 5.3. Схема развития «инструктивного» апоптоза

Интересна история открытия цитокина ФНО-α. В конце XVIII в. врачами было замечено, что у некоторых пациентов исчезали злокачественные опухоли после перенесения ими инфекционного заболевания. В начале XX в. американский врач W. Coley пытался лечить онкологических больных, вводя им препараты, полученные фильтрованием культур грамположительных и грамотрицательных бактерий. В некоторых случаях эта терапия приводила к успеху.

В дальнейшем уже в середине XX в. после открытия липополисахарида – вещества, входящего в состав мембран микробных клеток, – было показано, что это вещество способно индуцировать некроз опухолей. Однако в 1975 г. благодаря работам L. Old и его коллег стало ясно, что некроз опухолей вызывает не сам липополисахарид, а некий белковый фактор, который вырабатывается макрофагами при их контакте с бактериями. Этот белковый фактор и получил название «фактор некроза опухолей».

К концу XX в. стало ясно, что ФНО вырабатывается не только активированными макрофагами, но и Т-лимфоцитами, нейтрофилами, тучными клетками, астроцитами и клетками – натуральными киллерами (NK-клетками). В настоящее время твердо установлено, что ФНО способен индуцировать апоптоз самых различных клеточных структур, в том числе и опухолевых клеток. Кроме того, являясь провоспалительным цитокином, ФНО способен вызывать и некроз клеток как результат их гибели в очаге.

Важным элементом механизма «инструктивного» апоптоза являются рецепторы клетки, способные соединяться с указанными цитокинами воспаления (рис. 5.4).

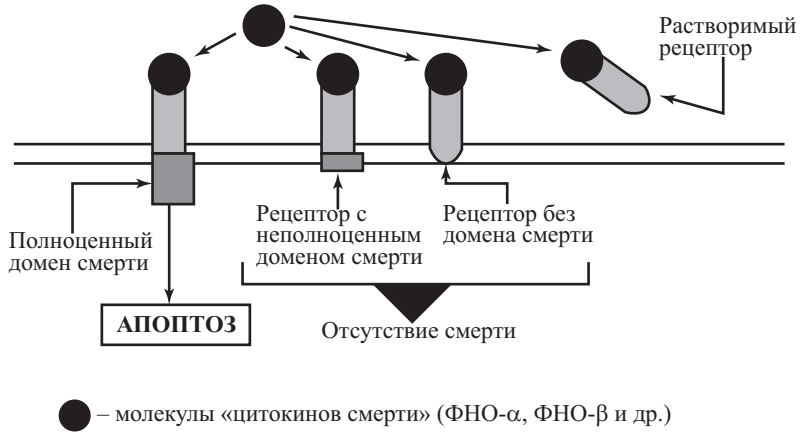

Рис. 5.4. Механизмы защиты клетки от апоптоза (рецепторы-приманки)

Эти рецепторы (белковые макромолекулы) принадлежат к суперсемейству рецепторов ФНО-α и в силу их особой функции получили название «рецепторы смерти» (Death Receptors). Внутрицитоплазматическая часть этих рецепторов получила название «домены смерти» (см. рис. 5.3). После соединения с этими рецепторами их лиганд (ФНО-α, ФНО-β и др.) – активированный домен смерти – при посредстве сложной ферментной системы (адапторного белка) осуществляет автокаталитический процессинг прокиназ, которые в свою очередь активирую киназы, входящие в состав каскада казнящих киназ. Их ферментативное воздействие и осуществляет апоптоз по уже известной схеме.

Следует иметь в виду, что определенную роль в активации киназного каскада играют ионы Ca^{2+}, проникающие в клетку через кальциевые каналы, открытию которых также способствует активация рецепторов смерти.

Клетки способны не только подчиняться лигандам клеточной смерти, но и защищаться от их воздействия. Такая защита может осуществляться двумя способами (рис. 5.4). Во-первых, клетки способны синтезировать неполноценные рецепторы смерти, которые или вообще лишены домена смерти, или имеют неполноценный домен смерти. И в том, и в другом случае соединения ФНО с рецептором смерти не приводят к реализации апоптоза, так как воздействие лиганда на рецептор

не передается исполнительному аппарату апоптоза. Во-вторых, клетка способна «слущивать» с себя экстрацеллюлярную часть рецепторов, которые при этом становятся так называемыми растворимыми рецепторами. Появляющиеся в межклеточном пространстве молекулы ФНО прочно соединяются с ними и уже не могут воздействовать на реальные клеточные рецепторы смерти.

Контрольные вопросы

1. Как можно охарактеризовать схему развития «инструктивного» апоптоза?
2. Какова история открытия фактора некроза опухолей ФНО-α?
3. Какими структурами организма вырабатывается ФНО?
4. Какую схему, отражающую механизмы защиты клетки от апоптоза, можно начертить? Как можно ее охарактеризовать?

5.3.6. Эмбриональный апоптоз

В процессе развития эмбриона апоптоз может играть как положительную, так и отрицательную роль. Пусковыми факторами апоптоза эмбриональных клеток в большинстве случаев являются дефицит апоптозподавляющих факторов в межклеточной среде, недостаток факторов роста или неспособность эмбриональных клеток воспринимать воздействие этих факторов, а также лишение эмбриональных клеток субстрата адгезии (рис. 5.5). Апоптоз нервных клеток может индуцироваться и

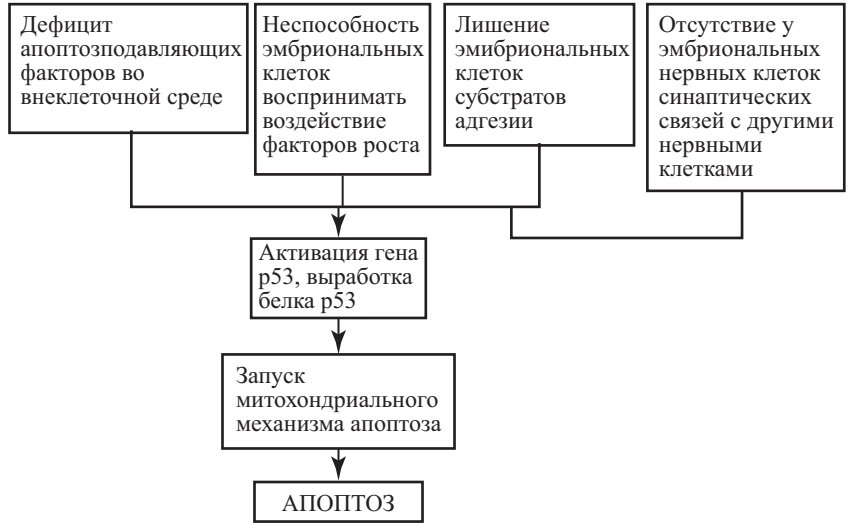

Рис. 5.5. Схема осуществления эмбрионального апоптоза

в том случае, если они не образуют или утрачивают синаптические связи со своими соседями. Кстати, последний механизм действует не только в эмбриональной нервной системе, но и во взрослом организме.

Контрольные вопросы

1. Какие факторы являются пусковыми факторами апоптоза эмбриональных клеток?
2. В чем заключается особенность индуцирования апоптоза нервных клеток?
3. Какую схему осуществления эмбрионального апоптоза можно начертить? Как можно ее охарактеризовать?

5.3.7. Апоптоз стареющих клеток

В настоящее время известно, что соматические полностью дифференцировавшиеся клетки способны к ограниченному числу делений, т.е. подчиняются так называемому лимиту Хейфлика (по имени ученого Л. Хейфлика, впервые описавшего это явление).

Ограничение количества делений полностью дифференцировавшихся клеток объясняется тем обстоятельством, что хромосомы таких клеток имеют на своих концах специализированные структуры – теломеры (одноцепочечную ДНК, которая с каждым делением укорачивается на 300–400 нуклеотидов). Поскольку теломеры играют решающую роль в стабилизации хромосом во время репликации, их отсутствие останавливает митоз в точках G_1 и G_2. Исключением из этого правила являются так называемые иммортальные (бессмертные) клетки, к которым относятся половые клетки, стволовые тотипотентные клетки, а также клетки злокачественных опухолей, способные делиться неограниченное число раз. Это явление получило объяснение благодаря экспериментам двух ученых – К. Грейдер и Э. Блэкбёрн, которые в 1985 г. выделили из таких клеток фермент теломеразу, способный компенсировать укорочение хромосом, достраивая в них нуклеотиды (теломеры).

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, содержащий матрицу для синтеза теломерных повторов ДНК. Иначе говоря, теломераза является своеобразной обратной транскриптазой.

Однако остановка клеточного деления – это тревожный сигнал для генетических программ, отвечающих за клеточную безопасность. Ранее мы уже говорили о том, что в клетке, получившей определенное повреждение, активируются гены (p21, p53), которые блокируют митоз в «чекпойнтах» G_1 и G_2. Остановка митоза в клетках, достигших лимита Хейфлика, по принципу обратной связи вызывает активацию гена p53 и выработку белка p53, индуцирующего апоптоз. Стареющая клетка прекращает свое существование (рис. 5.6).

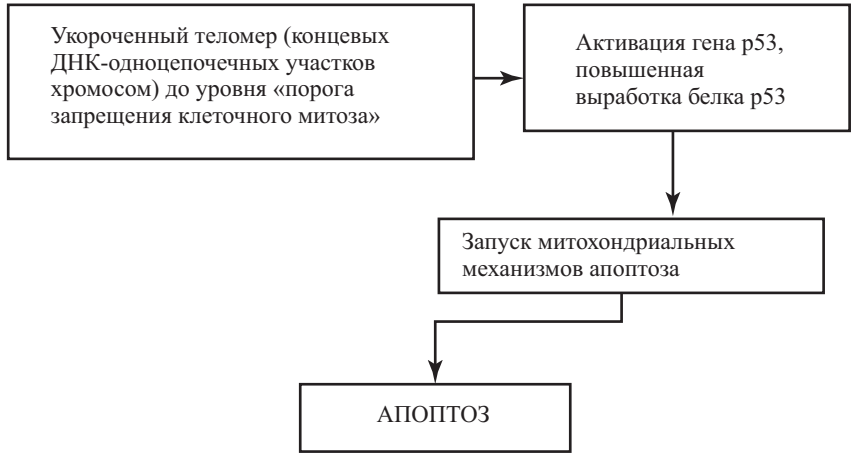

Рис. 5.6. Апоптоз стареющих клеток

Контрольные вопросы

1. Что означает и чем обусловлен лимит Хейфлика?
2. Какое явление получило объяснение благодаря экспериментам двух ученых – К. Грейдер и Э. Блэкбёрн?
3. Какую схему апоптоза стареющих клеток можно начертить?

5.3.8. Злокачественные опухоли и апоптоз

При изучении проблем канцерогенеза было отмечено, что одним из наиболее эффективных методов борьбы организма с малигнизацией клеток является их апоптоз. Если иммунные механизмы борьбы с клетками злокачественных опухолей включаются только тогда, когда в организме уже появились ненормальные клетки-мутанты, то апоптозный механизм реагирует на возможность малегнизации клетки уже в тот момент, когда обнаруживается первичное повреждение ДНК.

В этом случае предпосылкой к активации механизмов апоптоза является отсутствие эффекта от деятельности репарации разных систем, пытавшихся «залечить» повреждение ДНК. Нерепарированное повреждение ДНК благодаря пока еще мало изученным механизмам обеспечивает включение и активацию гена опухолевого супрессора p53. Повышенная же выработка белка p53 вызывает к жизни ряд последовательных событий:

• активацию гена p21 и выработку белка p21, блокирующего митотический цикл на уровне G_1 и G_2;

• блокирование антиапоптозных факторов (в частности, белка Bcl-2 и некоторых других);

• запуск митохондриального механизма апоптоза;

• повышенный синтез рецепторов смерти клетки;

• завершение апоптоза благодаря активации каскада «казнящих каспаз» (рис. 5.7).

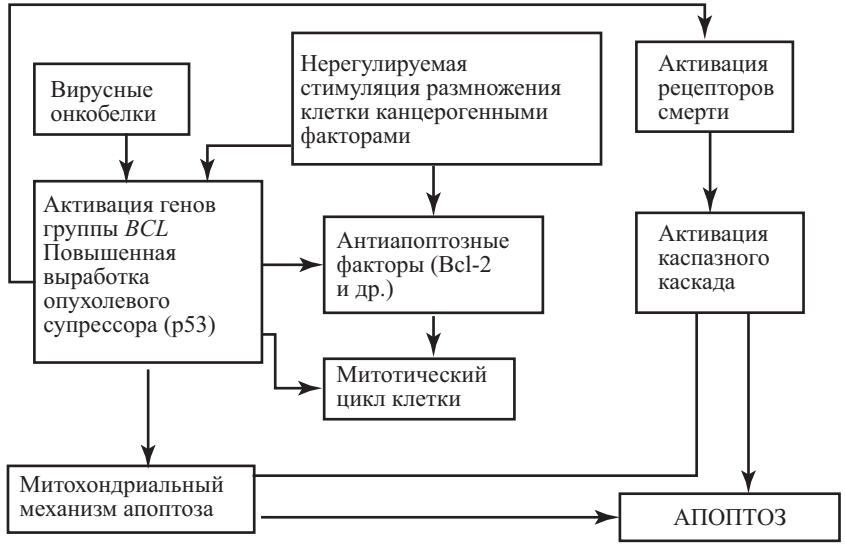

Рис. 5.7. Роль опухолевого супрессора p53 в борьбе с малигнизацией клеток

Так развиваются события в том случае, если развитие апоптоза опережает интенсивность пролиферации малигнизированных клеток. Однако если антиапоптозные механизмы сохраняют жизнь клетки-мутанта, если она успевает дать начало клону своих потомков, опухоль стремительно растет со всеми печальными последствиями этого процесса.

Контрольные вопросы

1. Почему апоптоз является одним из наиболее эффективных методов борьбы организма с малигнизацией клеток?
2. К какому ряду последовательных событий приводит повышенная выработка белка p53?
3. Какую схему, иллюстрирующую роль опухолевого супрессора p53 в борьбе с малигнизацией клеток, можно начертить?

5.3.9. Радиотерапия и апоптоз

Апоптоз находят в опухоли как до лучевого лечения, так и после. Для апоптоза характерно поражение отдельных клеток, отсутствие воспалительной реакции в тканях, быстрый фагоцитоз и переваривание погибших клеток. Изменения клеток при апоптозе заключаются в маргинации хроматина и его распаде на фрагменты, конденсации цитоплазмы, разделении клетки на части с отделением последних в виде апоптотических тел. Считают, что при апоптозе происходит активация механизмов саморазрушения вместо процессов дегенерации, как это происходит при некрозе. Факторы, вызывающие апоптоз клеток, и его механизмы исследуются, но установлено, что радиация, гипертермия и химиотерапия опухолей ускоряют процесс.

Лечебные воздействия меняют гистофизиологию опухоли, пролиферацию (деление), дифференцировку и рост клеток, их соединение и перемещение, интенсивность специфического функционирования (если оно сохранилось), способность к клеточной и тканевой регенерации, чувствительность к влияниям внешней среды и др.

Пролиферативная способность клеток опухоли – не только мишень для изыскания новых лекарственных химиотерапевтических средств и совершенствования известных методов лечения злокачественных новообразований, но и достоверный непосредственный морфологический критерий эффективности терапии, а также один из ведущих показателей степени патоморфоза.

Как известно, с точки зрения пролиферативной способности опухолевая и нормальная ткани состоят из двух субпопуляций клеток: пролиферирующей (фракция роста, пролиферативный пул) и покоящейся. Последнюю образуют клетки, временно выходящие из клеточного цикла и сохраняющие способность делиться (фаза G_0), а также непролиферирующие клетки. Ионизирующее излучение, особенно лекарственные химиотерапевтические средства, действует в основном на фракцию роста, т.е. на все быстрорастущие опухоли, в которых большая часть клеток находится в состоянии пролиферации (например, лейкозы, лимфосаркомы, хорионэпителиома матки, саркома Юинга), является высокочувствительным к химиотерапевтическим воздействиям и облучению.

Многочисленные исследования клеточного цикла в опухолях представляют интерес с двух точек зрения. Во-первых, информация о клеточном цикле необходима для понимания природы опухолевого роста. Во-вторых, с детальным знанием закономерностей клеточного размножения в опухолях связана выработка оптимальных схем лучевой и химиотерапии опухолей. Основным методом определения параметров клеточного цикла является анализ изменения процента меченых митозов после введения Н-тимидина.

Радиоавтография как никакой другой метод «оживила» морфологию и способствовала превращению последней из формально динамичной, какой она была до сих пор, в действительно динамичную. Но вместе с тем серьезным недостатком радиоавтографии, регистрируемой на уровне световой микроскопии, является то, что она относит центры интенсивного синтеза вещества целиком к ядру или к цитоплазме, а не к тем органеллам, в которых они в действительности осуществляются. Кроме того, современные технические возможности ограничивают использование метода в клинике из-за его длительности, необходимости повторных биопсий и возможности вредного действия изотопа на больного. Несмотря на ограничения метода, удалось получить данные о длительности разных фаз клеточного цикла в некоторых опухолях человека.

Большую практическую значимость приобрел метод инкубации биопсийного и операционного материала в среде с Н-тимидином *in vitro*, с помощью которого определяют индекс метки, равный отношению меченых клеток к общему количеству клеток, умноженному на 100. Данные разных авторов для различных опухолей и даже для различных участков одного и того же новообразования часто значительно расходятся, что связывают во многом с погрешностями метода. Поэтому для получения достоверных результатов приходится исследовать несколько кусочков ткани. Метод радиоавтографии *in vitro* успешно используется для контроля лечения опухолей.

Приведем два примера. Митотический режим аденокарцином прямой кишки при различных методах предоперационного облучения изменяется следующим образом. В необлученной высокодифференцированной аденокарциноме митотический индекс составил 25,6%, в умеренно дифференцированной – 35,2%. Определялось преобладание метафаз (78,9% в высокодифференцированной и 70,2% в умеренно дифференцированной аденокарциноме) над другими фазами митоза, что является характерным для опухолей человека. Патологические митозы составили 29,3% в высокодифференцированной и 23,2% в умеренно дифференцированной аденокарциноме (отставание хромосом в метафазе, рассеивание хромосом, трехгрупповая метафаза и др.). После облучения происходит достоверное уменьшение уровня митотической активности и увеличение числа патологических митозов. В высокодифференцированной аденокарциноме после облучения дозой 20 Гр митотический индекс снижен до 15%, а доля патологических митозов увеличена до 86,7%; в умеренно дифференцированной аденокарциноме – до 29,4% и 61,2% соответственно. При дозе 40 Гр митотическая активность в высокодифференцированной аденокарциноме – 46%, в умеренно дифференцированной – 7,2%, а доля патологических митозов увеличилась соответственно до 91,3% и 100%. Особенно резкие изменения пролиферативной способности клеток наблюдались при комбинации лучевой и химиотерапии.

Исследован митотический режим рака гортани при лучевом лечении с применением радиосенсибилизатора метронидазола. Лучевые изменения характеризовались уменьшением численности клеточной популяции за счет некроза и апоптоза, снижением пролиферативного пула клеток, патологическими митозами и угнетением синтеза ДНК. Так, до лечения индекс метки составлял 6,05 (неороговевающнй рак – 7,33; ороговевающий рак – 5,0), после лечения – 2,50 (P > 0,001) (неороговевающнй рак – 3,24, P > 0,01; ороговевающий рак – 1,60, P > 0,001).

При сравнении разных суммарных очаговых доз достоверных различий величии индекса метки не отмечено (20 Гр – 2,70; 32 Гр – 2,35).

Необходимо заметить, что достоверность результатов измерений у одного больного (разные участки центра и периферии опухоли до лучевой терапии и после) и группы больных совпадали не всегда. Например, низкий индекс метки можно было встретить в ороговевающем раке до лечения и в обоих гистологических типах рака после лечения. Поэтому вопрос о значимости параметров пролиферации для оценки радиочувствительности опухоли нельзя отнести к окончательно решенному.

Следует упомянуть об эффекте синхронизации митотической активности опухолевых клеток, который был использован в практике лучевой и химиотерапии. Сущность эффекта заключается в том, что с помощью лекарственного средства (например, 5-фторурацила) клетки блокируют на определенной фазе клеточного цикла, а после отмены препарата все они синхронно переходят в следующую фазу цикла. Зная время прохождения клетками этого интервала, можно подвергнуть опухоль облучению или полихимиотерапии в одной из наиболее чувствительных фаз цикла.Так, при комплексном лечении больных раком прямой кишки с использованием 5-фторурацила в опухоли находили глубокие и распространенные повреждения раковых клеток и опухолевых структур вплоть до их полного разрушения. Широкое практическое использование эффекта синхронизации митотической активности опухолевых клеток затруднено из-за необходимости длительного (15–20 ч) введения больному 5-фторурацила, токсичности препарата, отсутствия надежного контроля изменений временны́х параметров клеточного цикла и наличия в опухоли покоящихся клеток.

Контрольные вопросы

1. На какую субпопуляцию клеток ткани в основном действуют ионизирующее излучение и особенно лекарственные химиотерапевтические средства?

2. Каким образом изменяется митотический режим аденокарцином прямой кишки при различных методах предоперационного облучения?

3. В чем заключается сущность эффекта синхронизации митотической активности опухолевых клеток, который используется в практике лучевой и химиотерапии?

5.4. Апоптоз и некроз

Еще в 50-е гг. XX в. было установлено, что значительная часть клеток кроветворной и лимфоидной тканей погибает непосредственно после облучения с образованием полимерных фрагментов ДНК – полидезоксинуклеотидов (ПДН). Электрофоретическая характеристика ПДН выявила дисперсность по молекулярной массе составляющих его фрагментов ДНК, формирующих на электрофореграмме характерную «лесенку». Эта «лесенка», став маркером апоптоза, послужила мощным инструментом развития исследований в области изучения механизмов сначала радиационного, а затем и физиологического апоптоза.

Анализируя данные, характеризующие проявления радиационной гибели клеток, К.П. Хансон в 1979 г. впервые высказал мысль о том, что радиационная гибель происходит в интерфазе наиболее радиочувствительного типа клеток – лимфоцитов и биохимические механизмы ее проявления (от клеточного до организменного уровня) представляют собой не что иное, как события реализации содержащейся в геноме каждой клетки программы ее естественной гибели. Несколько ранее, в 1972 г., группа авторов описала патоморфологическую картину интерфазной гибели клеток и указала на необходимость различать в ней два разнородных явления – апоптоз и некроз. Вкратце о морфологических и биохимических различиях этих двух процессов было изложено в § 5.3.

Остановимся подробнее на различиях этих двух процессов. Как вам уже известно, апоптоз рассматривается как программируемая, генетически опосредуемая форма клеточной гибели, при которой внешние или внутренние сигналы дают импульс клетке к образованию или активации некоторого количества предсуществующих ферментов, приводящих ее к самоуничтожению. В противоположность этому некроз является следствием внешнего повреждения клетки, ведущего к нарушению упорядоченного клеточного метаболизма с утратой способности поддерживать ионный гомеостаз.

При апоптозе клетки утрачивают контакт с ближайшим окружением, уменьшаются в размерах, их хроматин конденсируется. ДНК деградирует по межнуклеосомным линкерным участкам с образованием фрагментов, размеры которых кратны 180–200 полинуклеотидам. В мембранах апоптозных клеток возникают поперечные сшивки, приводящие к

локальному упрочению этих структур. Апоптотические клетки «упаковывают» свое содержимое в малые мембраносвязанные пузырьки, называемые апоптотическими тельцами, которые быстро фагоцитируются макрофагами и близкорасположенными эпителиальными клетками без иммунного ответа. В противоположность этому некротические клетки выбрасывают свое внутриклеточное содержимое, провоцируя воспалительную реакцию. Апоптоз развивается в отдельных, удаленных друг от друга клетках, некроз – в группах клеток, имеющих взаимные контакты.

Апоптоз – форма естественной гибели клеток и условие естественного обновления и смены клеточных популяций. Патологической формой гибели он становится только в определенных условиях. Некроз же – всегда проявление неестественной смерти, он никогда не возникает в нормальной клеточной кинетике, при нормальном эмбриональном развитии и метаморфозе. Некроз детерминирован не факторами, присущими самой клетке, а воздействиями внешней среды, достигающими повреждающей силы. Но и апоптоз, и некроз развиваются при воздействии на клетки разнообразных повреждающих агентов – ультрафиолетового, рентгеновского или γ-излучения, кислородных радикалов, тепла, тяжелых металлов или цитотоксических веществ. Какой из типов реакции возникнет – выживание или гибель, – зависит от интенсивности воздействия. При низких уровнях активируются стресс-реакции, обеспечивающие выживание клеток. Средние, а иногда и высокие уровни повреждающих воздействий активируют программу их самоубийства, реализующуюся в апоптоз. Высокие уровни повреждения приводят к внезапной утрате клетками способности к поддержанию гомеостаза с исходом в некроз. Радиационно-индуцированный некроз клеток млекопитающих вызывает облучение только в дозах, близких к минимальным абсолютно летальным или превышающим их.

В табл. 5.1 представлена детальная характеристика апоптоза как биологического явления и дифференциально-диагностические отличия его от некроза.

Таблица 5.1. **Сравнительная характеристика апоптоза и некроза клеток**

Показатель	Апоптоз	Некроз
1	2	3
Пусковой фактор	Сигнал, воспринимаемый мембранными рецепторами, или отсутствие физиологического сигнала	Токсические и мембранотропные агенты, неадекватные внешние условия

Окончание табл. 5.1

1	2	3
Скорость развития	1–12 ч	В пределах 1 ч
Локализация первичного повреждения	В ядре	В мембране
Причины гибели клетки	Деградация ДНК, нарушение энергетики клетки	Нарушение целостности мембраны
Изменение размера клетки	Уменьшение (сморщивание)	Увеличение (набухание)
Изменения ядра	Конденсация хроматина, пикноз, фрагментация	Набухание
Изменения в цитоплазме	Конденсация цитоплазмы, уплотнение гранул	Лизис гранул
Изменения клеточной мембраны	Потеря микроворсинок, образование вздутий	Нарушение целостности
Состояние ДНК	Разрывы с образованием сначала крупных, затем мелких фрагментов	Неупорядоченная деградация
Энергозависимость	Зависит	Не зависит
Зависимость от синтеза макромолекул	Зависит	Не зависит
Примеры проявления	Метаморфоз, отрицательная селекция лимфоцитов, гормон-зависимая атрофия, интерфазная радиационная гибель лимфоцитов	Гибель клеток от гипоксии, действия токсинов, вирусный цитолиз, комплемент-зависимый цитолиз
Методы выявления		
Морфологические	Сморщивание клеток	Набухание клеток
Тинкториальные	Ослабление окрашиваемости ДНК-тропными красителями	Восприятие суправитальных красителей
Цитофлюориметрические	Гиподиплоидность, уменьшение размеров клетки	–
Электрофоретические	Формирование дискретных фракций («лесенки») при электрофорезе	Размазанное пятно при электрофорезе ДНК

Молекулярные механизмы апоптоза. Механизм апоптоза, удивительно сходный у разных видов животных, протекает в три стадии:

- индукции (сигнальная стадия);
- активации путей реализации (стадия контроля и исполнения);
- деградации (стадия деструктивных изменений).

В двух последних стадиях участвует семейство цистеинсодержащих ферментов под названием «каспаз». У млекопитающих это семейство состоит из 12 ферментов, подразделяющихся на два класса: регуляторные каспазы (такие, как каспаза-8, FADD-подобный интерлейкин-lp-конвертирующий фермент, обозначаемый также MACH, Mch5, и каспаза-9 – Mch6, а также эффекторные каспазы, такие как каспаза 3 (apopapain) и каспаза 6 (Mch2).

Сигнальная стадия. Активация сверочных точек клеточного цикла и репарации ДНК имеет два исхода: возобновление клеточной пролиферации или апоптоз. Выбор определяется длительностью активации JNK-регуляторного пути сигналом повреждения (рис. 5.8).

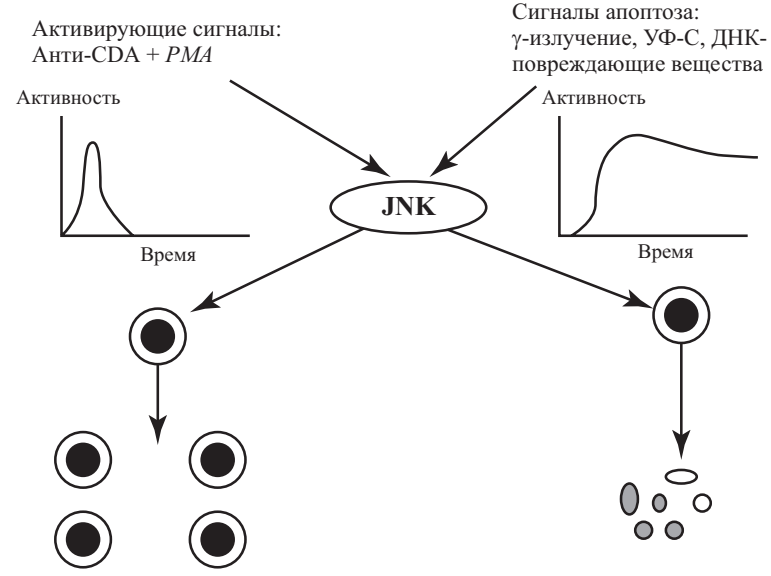

Рис. 5.8. Длительность индукции JNK-сигнального пути является определяющим фактором для клеточной пролиферации либо апоптоза

Возмущающие сигналы, или сигналы легко устранимого повреждения, являются кратковременными, в ответ на них клетка вступает на путь пролиферации. Сигналы трудно устранимого повреждения

поддерживают сигнальный путь JNK в активном состоянии долго, и это приводит к включению механизмов апоптоза. В зависимости от того, исходит сигнал от ДНК или от мембранных структур, различают Тр53-опосредуемый и Тр53-независимый апоптоз.

Тр53-опосредуемый апоптоз имеет в основе повреждение ДНК, устранение которого обусловлено активацией опухолевого супрессорного гена *Тр53* в результате накопления белка р53 (вследствие его стабилизации под влиянием протеинкиназной активности белков ATM и ATR – ataxiateiangiectasia-related). Ключевым событием в запуске Тр53-опосредуемого апоптоза является транскрипционная активация гена *Noxa* на фоне остановки клеточного цикла в сверочных точках и репарации ДНК. Причина активации транскрипции гена *Noxa* пока неизвестна.

Стадия контроля и исполнения. Продукт гена *Noxa* поступает в митохондрии, взаимодействует с белком Bax, входящим в проапоптотическое подсемейство белков семейства Bcl-2, вызывая повреждение митохондрий. Нарушение мембранного потенциала митохондрий приводит к выходу цитохрома с из межмембранного пространства в цитоплазму. Цитохром с совместно с Apaf-1 (apoptoticprotease-activatingfactor-1) в присутствии дАТФ или дАДФ активирует каспазу-9, та в свою очередь – каспазу-3, участвующую в окончательной деструкции клетки.

Хорошо охарактеризован второй механизм р53-зависимого контроля реализации апоптоза. В результате трансактивации белком р53 соответствующих генов происходит синтез лигандов и связывание их со своими рецепторами, называемыми рецепторами смерти (deathreceptors, DR). Это рецепторы: CD95 (старое название – рецептор для FasL или Apo-IL); фактора некроза опухоли ФНО-β; DR3, DR4 (TRAIL–TNF-relatedapoptosis-inducingligand (старое название – Apo-2L) и DR5 (KILLER). Последние два фактора характерны только для опухолевых клеток человека.

Сигнальный путь CD95, типичный для всех рецепторов, представлен на рис. 5.9.

Лиганд CD95L связывается собственным рецептором, активированный рецептор через адаптерную молекулу FADD (Fas-associated-deathdomainprotein) приводит к аутокаталитической активации прокаспазы-8 в каспазу-8. Последняя активирует эффекторную каспазу-3. Если активация каспазы-8 слабая, она может быть усилена через митохондриальный механизм. В этом случае в процесс, обычно протекающий при участии апоптоз-промотирующего фактора Bax из семейства Bcl-2, включается фактор Bid из того же семейства, но

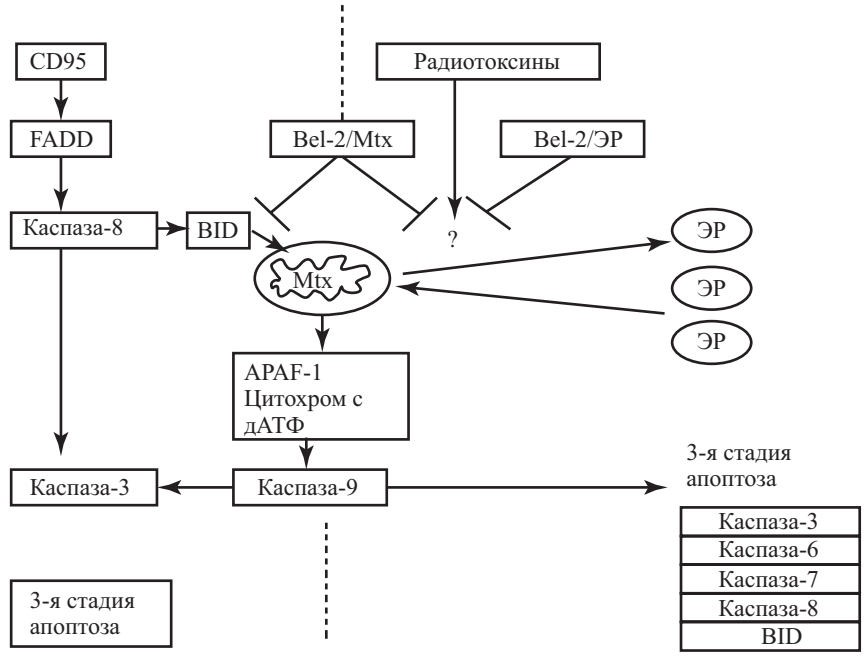

Рис. 5.9. Схематическая модель влияния субклеточной локализации Bcl-2 на две формы апоптоза – с использованием Тр53-регулируемого пути через CD95 и через Тр53-независимый митохондриальный механизм

антиапоптотическая активность его подавляется белком Bel-2. Начальные стадии радиационно-индуцированной клеточной гибели протекают под контролем со стороны белка Bcl-2, влияющего на взаимодействие между митохондриями и эндоплазматическим ретикулумом, находящимся выше активации каспаз. Эндоплазматический ретикулум может вызывать нарушения в кальциевом гомеостазе и влиять на другие связаннные с ним проапоптотические молекулы.

Тр53-независимый апоптоз. Существует и иной вариант митохондриального пути, отличный от показанного на рис. 5.9, когда из митохондрий в результате открытия пор проницаемости и утраты протонного и электрического градиентов на внутренней митохондриальной мембране выходит белок под названием «апоптоз-индуцирующий фактор» (apoptosis-inducingfactor, AIF), прямо активирующий каспазу-3.

Другим независимым от белка Тр53 механизмом апоптоза является сфингомиелин-церамидный сигнальный путь, характерный для стресс-индуцируемого апоптоза в различных нормальных и опухолевых

клетках. Он регулируется протеинкиназой С, выполняющей антиапоптотическую функцию, и запускается повышением содержания церамида (в результате усиления его синтеза) или распада сфингомиелина биомембран (под действием соответственно церамидсинтазы или сфингомиелиназы, активируемых липидными пероксидами).

Апоптотическим сигналам до наступления третьей, терминальной стадии апоптоза противодействует контрольный механизм при участии ряда семейств белков с антиапоптотическими функциями, в частности, например, семейства Bcl-2.

Недавно идентифицирован белок BAR (biiunctionalapoptosisregulator), способный подавлять передачу апоптотических сигналов как по внешнему (через рецепторы), так и по внутреннему (от биомембран) пути. Таким образом, регуляция апоптоза представляет собой пример сбалансированного механизма с многократным дублированием противовесов, призванным обеспечить надежный контроль за поддержанием клеточного гомеостаза в процессе преодоления клеткой последствий повреждения. На этой основе в настоящее время проводятся широкий поиск и изучение потенциальных модификаторов апоптоза, часть из которых, несомненно, может оказаться эффективными противолучевыми средствами.

Стадия деструктивных изменений. Когда сигнал апоптоза выходит на эффекторные каспазы и приводит к их активации, процесс становится необратимым. Эффекторные каспазы, обычно расположенные в неактивном состоянии в цитоплазме клетки, после каскада активаций со стороны регуляторных каспаз переходят в ядро и атакуют в общей сложности около двух десятков структурных и функциональных белков, включая белки проведения сигналов и цитоскелетные. Большинство расщепляется каспазами-3 и -7, ламин – избирательно каспазой-6. Расщепление каспазами DFF450-цитоплазматического ингибитора апоптоз-специфической эндонуклеазы DFF40 (фактора фрагментации ДНК) приводит к активации этой ДНК-азы, переходу ее в ядро и осуществлению межнуклеосомной фрагментации геномной ДНК.

На рис. 5.10 представлена схема молекулярных и биохимических событий, лежащих в основе радиационных апоптоза и некроза.

Важной констатацией этой схемы является то, что при воздействиии ионизирующего излучения в широком диапазоне доз свойственные клеткам молекулярные и биохимические механизмы реагирования на внешние и внутренние факторы сохраняют свою активность, остаются способными выполнять свои функции.

Более того, оказывается сохраненным механизм физиологического апоптоза, и он в определенном диапазоне доз выступает как главная молекулярная основа клеточного опустошения, являющегося одним из наиболее значимых клинических проявлений острой лучевой патологии.

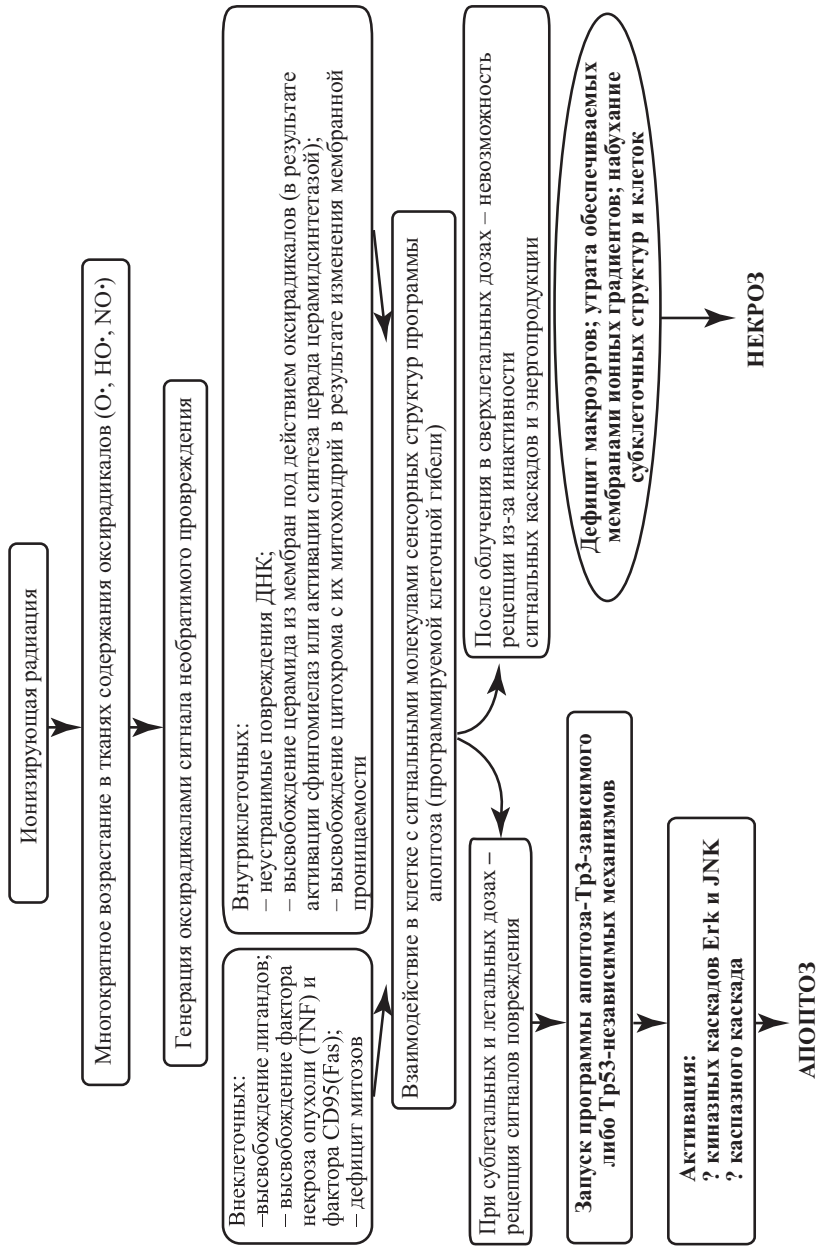

Рис. 5.10. Общая схема молекулярных событий, приводящих к возникновению радиационных апоптоза и некроза

Радиационный некроз возникает только при общих или местных воздействиях в дозах абсолютно летального диапазона, приводящих к существенным нарушениям митохондриального окислительного фосфорилирования, к инактивации под действием радиационных радикалов и активных форм кислорода генетических механизмов регуляции клеточной жизнедеятельности, опосредуемых ДНК и соответствующих регуляторных сетей.

При некрозе вследствие утраты K^+-, Na^+-ионных градиентов внутриклеточные пространства оказываются переполненными водой, что приводит к безмерному набуханию клетки. Прочность плазматической мембраны оказывается неспособной противостоять росту давления осмотических сил, и мембрана разрывается, «вываливая» клеточное содержимое из набухших до предела микроструктур в межклеточное пространство. Немедленной реакцией со стороны ткани на появление этого материала становится воспаление.

При этом главное различие между апоптозом и некрозом состоит в том, что апоптоз – это высоко упорядоченный процесс, реализуемый по заложенной природой генетической программе элиминации избыточных или дефектных клеток с помощью физиологически дееспособных молекулярных структур и механизмов. Некроз же есть следствие полной инактивации повреждающим агентом этих структур и механизмов в группе клеток, образующих участок ткани, в результате чего полностью утрачивается координация процессов метаболизма и взаимодействие субклеточных структур, и ферментные реакции приобретает характер беспорядочной атаки «всех против всего».

Контрольные вопросы

1. Каковы основные отличия апоптоза от некроза?
2. Каке существуют стадии апоптоза?
3. В чем заключается роль сигнальной стадии апоптоза?
4. Как можно охарактеризовать методы выявления апоптоза и некроза?
5. Как различают Тр53-опосредуемый и Тр53-независимый апоптоз?
6. Какие процессы происходят на стадии контроля и исполнения апоптоза?
7. В чем суть не зависимых от белка Тр53 механизмов апоптоза?

Глава 6

КРИВЫЕ ВЫЖИВАНИЯ КЛЕТОК

6.1. Кривые репродуктивной и интерфазной гибели клеток

Для частоты радиоиндуцированных хромосомных аберраций характерна строгая зависимость от дозы, мощности и характера ионизирующего излучения, что позволило создать цитогенетические методы биологической дозиметрии.

Механизм возникновения хромосомных перестроек остается еще далеко не ясным. Частота хромосомных перестроек зависит от внешних агентов (ионизирующих излучений, химических веществ) и физиологического состояния организма.

В животном организме клетки одних тканей (кроветворные, половых органов, слизистой кишечника) активно делятся, воспроизводя себе подобные; клетки других тканей (почек, печени, сердца, мышц, нейроны и др.) делятся редко или вообще не делятся. Соответственно различают два вида гибели клеток – репродуктивную и интерфазную.

Репродуктивная гибель состоит в нарушении способности делящихся клеток к неограниченному воспроизводству: после одного-двух делений дефектные потомки клеток отмирают. При интерфазной гибели вскоре после облучения гибнут сами облученные клетки. Для всех делящихся и большинства неделящихся клеток интерфазная гибель наступает лишь при дозах в сотни грэй. Исключение составляют лимфоциты и половые клетки на некоторых стадиях их развития; они гибнут интерфазно уже при дозах в несколько десятков грэй.

Причины и закономерности репродуктивной и интерфазной гибели различны. Наиболее изучена репродуктивная гибель. Она наступает в результате повреждения молекулы ДНК, завершающегося разрывом одной или обеих ее нитей, что препятствует дальнейшему воспроизводству нормальных клеток.

Зависимость доли клеток, сохранивших репродуктивную способность после облучения в дозе D, имеет вид

$$N(\mathrm{D})/N(0) = \exp(-\mathrm{SD}) = \exp(-\mathrm{D}/\mathrm{D}_0).$$

где $N(0)$ и $N(\mathrm{D})$ – число клеток до и после облучения; величина $\mathrm{S} = 1/\mathrm{D}_0$ характеризует радиочувствительность клеток; D_0 – доза, снижающая число выживших клеток в *e* раз; для большинства делящихся клеток $\mathrm{D}_0 = (1{,}2–2{,}0)$ Гр.

Часто экспоненциальному участку дозовой кривой предшествует участок кривой с меньшим наклоном (рис. 6.1).

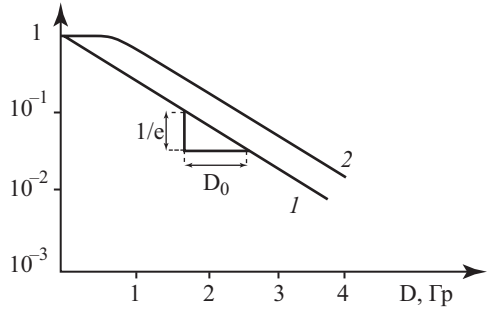

Рис. 6.1. Зависимость репродуктивной гибели клеток от дозы D:
по оси ординат – доля клеток, сохранивших репродуктивную способность; *1*, *2* – разные формы дозовых кривых

Радиочувствительность делящихся клеток зависит от многих факторов и может быть искусственно увеличена (сенсибилизация) или уменьшена (защита). Соответственно D_0 уменьшается или увеличивается.

Наиболее эффективным естественным сенсибилизатором является кислород. В его отсутствии поражение различных биологических объектов (макромолекул, клеток, организмов в целом), как правило, ослабляется. При этом D_0 для клеток увеличивается в 3 раза. С ростом линейной плотности ионизации радиочувствительность клеток и тканей возрастает.

Повреждение ДНК, обусловливающее репродуктивную гибель клетки, не является для нее фатальным благодаря существованию мощных систем восстановления (репарации). Часть возникающих в результате ионизации первичных повреждений репарируется химическими восстановителями, присутствующими в клетке.

Основным восстановителем является аминокислота глутатион. Она конкурирует с внутриклеточным кислородом, фиксирующим первичные повреждения, и препятствует их восстановлению. Повреждения, сохраняющиеся после этого физико-химического этапа репарации, эффективно устраняются ферментными системами, специфически репарирующими различные виды генетических повреждений.

Конечный поражающий эффект облучения обусловлен неотрепарированной частью первичных повреждений ДНК. Доля их в обычных условиях невелика (доли процента), что и обусловливает относительную устойчивость живых клеток к действию ионизирующих излучений.

С этим же связана возможность увеличить радиочувствительность, искусственно подавляя способность делящихся клеток к репарации, либо снизить их радиочувствительность, создавая условия для лучшей репарации потенциально поврежденной ДНК.

Механизм интерфазной гибели клеток изучен слабее, неясна и причина резкого отличия в радиочувствительности лимфоцитов от других видов клеток. В отличие от репродуктивной гибели изменения, ведущие к интерфазной гибели, наблюдаются во всех клетках, и с дозой облучения меняется не доля погибших клеток, а среднее время гибели всей популяции (рис. 6.2). Причина различий, по-видимому, в том, что интерфазная гибель обусловлена повреждением не уникальной структуры ДНК, а мембран и других множественных структур клетки, опустошением популяций делящихся клеток и тканей так называемых критических органов, необходимых для жизнедеятельности. Такими органами являются кроветворные и пищеварительные.

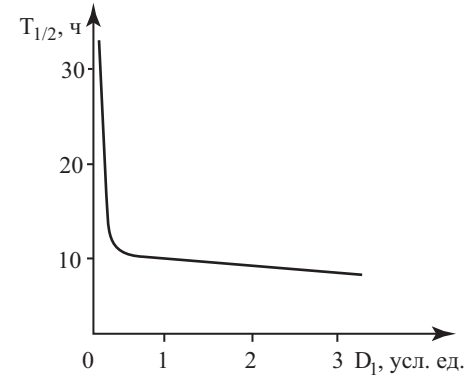

Рис. 6.2. Зависимость интерфазной гибели лимфоцитов от дозы:
по оси ординат – время гибели половины облученных клеток ($T_{1/2}$)

В кроветворных органах (костный мозг, селезенка) и тонком кишечнике есть активно делящиеся клетки, являющиеся родоначальниками (стволовыми) для всех функционирующих клеток крови и клеток тонкого кишечника, ответственных за всасывание питательных веществ. Репродуктивная гибель стволовых клеток, снижающая их численность ниже совместимого с жизнью критического уровня, приводит к гибели организма.

На рис. 6.3 приведена дозовая кривая гибели млекопитающих при облучении всего организма. Доза летальности 50% особей в популяции ($ЛД_{50}$) различна для млекопитающих разных видов, но форма дозовой кривой и причины гибели одинаковы.

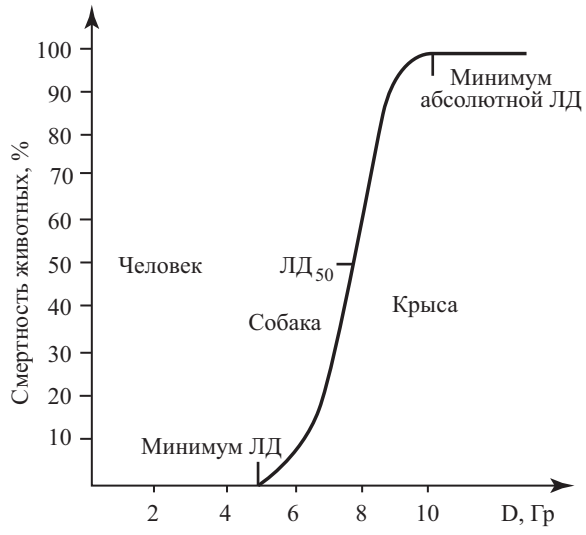

Рис. 6.3. Дозовая кривая гибели млекопитающих

При дозах порядка $ЛД_{50}$ критической для организма является система кроветворения, при больших дозах – слизистая оболочка тонкого кишечника. В первом случае часть животных гибнет через 10–14 дней, во втором – через 4–7 дней после облучения.

При D > 1 Гр вплоть до абсолютной летальной дозы у выживших особей наблюдается лучевая болезнь разной тяжести.

Существует ряд мер профилактической защиты организма от облучения. Наиболее эффективны два класса химических защитных веществ (радиопротекторов) при их введении за 10–15 мин до облучения. Это соединения, содержащие тиолы и индолил-алкиламины. Первые, подобно внутриклеточному глутатиону, способствуют физико-химической репарации первичных повреждений, конкурируя с кислородом и, по-видимому, способствуя ферментативной репарации. Вторые сужают сосуды и тем самым также ослабляют поражающее действие кислорода в облученных клетках критических органов.

В некоторых случаях возникает необходимость увеличить радиочувствительность клеток, например при радиотерапии опухолей. Сенсибилизаторами могут служить так называемые электрон-акцепторные соединения, роль которых аналогична действию кислорода, но они лучше проникают вглубь опухоли.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит отличие репродуктивной гибели клеток от интерфазной?
2. Какое уравнение, выражающее зависимость доли клеток, сохранивших репродуктивную способность после облучения в дозе D, можно привести?
3. Какой можно начертить рисунок, который отражает зависимость репродуктивной гибели клеток от дозы D?
4. Какой фактор обусловливает репродуктивную гибель клетки? Какое соединение является основным восстановителем первичных повреждений в клетке?
5. Каков предполагаемый механизм интерфазной гибели клеток?
6. Чем обусловлена радиационная гибель целостного организма млекопитающих?
7. Какой можно начертить график, который отражает зависимость интерфазной гибели лимфоцитов от дозы?
8. Какую можно начертить дозовую кривую гибели млекопитающих при облучении всего организма?
9. Какие части человеческого организма и при каких дозах являются наиболее критическими? Почему?
10. Какие меры профилактической защиты организма от облучения наиболее эффективны?

6.2. Энергетический обмен и радиационное поражение клеток

Энергетическое обеспечение жизнедеятельности клеток реализуется в митохондриях – специализированных органоидах извлечения энергии из пищевых субстратов и трансформации ее в макроэргические связи АТФ. Будучи самообновляющимися структурами с относительно коротким полупериодом существования (в гепатоцитах крыс – около 10 сут.), они имеют собственную ДНК и рибосомы для обеспечения самовоспроизведения. ДНК митохондрий содержит генетический код для 25–125 митохондриальных окислительных белков, и благодаря этому в клетке данные органоиды генетически относительно автономны.

Число и форма митохондрий зависят от активности и типа клеток. Соматические клетки млекопитающих содержат от 500 до 1000 этих органелл, локализованных вблизи мест расходования или запасания энергии: вдоль сократительных структур, во впячиваниях базальных мембран для обеспечения транспорта ионов против градиентов концентрации, в области синапсов нейронов и т.п.

Построенные по единому плану, они в различных клетках имеют палочковидную, гантелеобразную, нитевидную или округлую форму и размеры от 1 до 10 мкм. Наружная поверхность митохондрий сформирована из двух мембранных слоев, образующих межмембранное

пространство. Внутренняя мембрана образует выросты (кристы), внутримитохондриальный матрикс содержит ДНК, рибосомы и включения. Углеводные, жировые и липидные субстраты превращаются ферментами лимоннокислотного цикла Кребса и окисления жирных кислот (расположенных только в матриксе митохондрий) в $НАДН_2$, сукцинат, ацетилкоэнзим А, β-глицерофосфат, являющиеся окисляемыми субстратами. Перенос электронов с окисляемых субстратов на кислород осуществляется последовательно по цепи: флавопротеиды I и II, убихинон, цитохромы b, c_1, c, a, b, a_3 в соответствии с окислительным потенциалом (рис. 6.4).

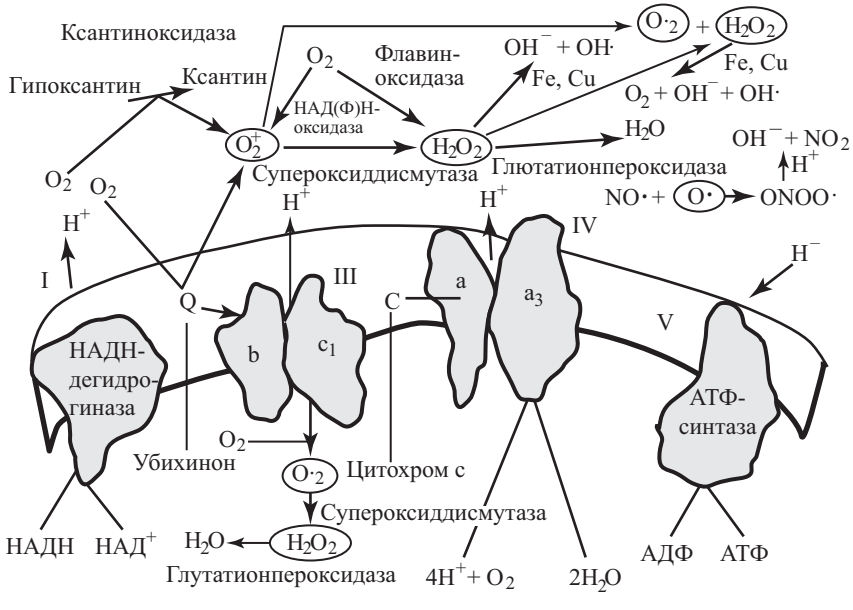

Рис. 6.4. Схема метаболической генерации активных форм кислорода в клетке

По мере перехода электронов в дыхательной цепи с высокого энергетического уровня на более низкий осуществляется окислительное фосфорилирование – энергия окисления кумулируется в трех молекулах АТФ. Ферменты цепи переноса электронов и фосфорилирования расположены преимущественно во внутренней мембране. Сопряжение процессов окисления и фосфорилирования осуществляется благодаря работе АТФ-синтетазного комплекса (протонтранслоцирующей АТФ-азы) (также расположенного во внутренней мембране митохондрий) путем преобразования химической энергии окисления в электрическую энергию (протонного градиента), а затем обратно в химическую энергию макроэргических связей.

Наряду с генерацией АТФ митохондрии участвуют в метаболической продукции активных форм кислорода.

Основываясь на представлениях о ключевой роли энергетического обмена в жизнедеятельности живых систем от клеточного уровня до организменного и наблюдая радиационно-обусловленные изменения фосфорилирования в субклеточных структурах органов животных и человека после облучения в широком диапазоне доз вплоть до минимальных абсолютно летальных, некоторые исследователи увидели в этом прямое указание на ведущую роль нарушения биоэнергетики в развитии радиобиологических эффектов и с достаточной определенностью утверждали, что одним из первичных механизмов биологического действия ионизирующего излучения является подавление биоэнергетических процессов.

Однако наблюдавшимся изменениям, которые принимали за радиационные нарушения в системах генерации АТФ в тканях (они оказались артефактом), противоречили устойчивость к действию ионизирующей радиации в дозе 8 Гр энергозависимого липидного синтеза в гепатоцитах (активация биосинтеза холестерина через 5 мин и фосфолипидов – через 40–60 мин вплоть до 48 ч), образования белков молока в лактирующей молочной железе (50 Гр), сохранение подвижности зрелых спермиев (доза 200 Гр). Этот ряд доказательств сохранения или даже активирования после облучения функциональной активности плазматических структур в клетках, устойчивых к действию радиации, был продолжен установлением способности клеток эндокринной системы обеспечивать продукцию гормонов гипофиза и надпочечников в явлении пострадиационного гиперкортицизма, клеток печени – в синтезе серомукоидов и других белков острой фазы лучевого поражения, в образовании гликогена – путем глюконеогенеза из продуктов деградации белков гибнущих клеток других органов, наконец, механизмов реализации таких радиационных эффектов в радиочувствительных тканях, как остановка клеточного цикла, репарация ДНК, апоптоз, протекающих с высоким потреблением АТФ при обязательном восполнении его за счет процессов фосфорилирования. Все эти данные указывают на иной, чем нарушение биоэнергетики, ведущий механизм формирования лучевого поражения.

Контрольные вопросы

1. Как устроены митохондрии, какую функцию они выполняют и какие процессы протекают в этой органелле?

2. Какую можно начертить схему метаболической генерации активных форм кислорода в клетке?

3. Какие данные указывают на то, что нарушение биоэнергетики не является ведущим механизмом формирования лучевого поражения?

6.3. Регуляторные сети ответа клеток на повреждающие воздействия

С открытием и изучением в последние годы молекулярных и биохимических механизмов регуляции ответа клетки на разнообразные повреждающие воздействия, проявляющегося изменением роста, развития (дифференцировки), пролиферации либо апоптоза, происходит существенное уточнение и углубление представлений о реальных механизмах формирования радиационного эффекта.

Установлено, что существует система проведения сигналов от рецепторов (сенсорного звена) к генетическому аппарату клетки, которая образована каскадами активируемых митогенами протеинкиназ (mitogen-activatedproteinkinase, MAPK). Каждый из каскадов – это модуль трех типов белковых (пептидных) молекул-протеинкиназ: MAPKKK (MAPK kinasekinase) → MAPKK (MAPK kinase) → MAPK. Последовательное фосфорилирование киназой верхнего уровня нижележащего фермента обеспечивает его активацию и передачу сигнала на включение клеточных программ дифференцировки, движения, деления либо гибели клеток путем апоптоза, у млекопитающих установлено три разнотипных киназных каскада, составленных из различающихся по молекулярной структуре ферментов. Клеточный ответ, состоящий в изменении пролиферации, дифференцировки и развития (старения) обеспечивают MAPK под названием ERKl/2-киназы (extracellularsignal-regulatedkinase 1 и 2); ответ, проявляющийся воспалением, апоптозом, изменением развития, обеспечивают MAPK двух типов: JNK / SAPK (c-JunN-terminalkinase / stressactivatedproteinkinase – терминальные киназы клеточных сочленений / стресс-активируемые протеинкиназы) и p38 MAPK. Таким образом, разные ответы клетки на определенные стимулы обеспечиваются соответствующими модулями киназ, т.е. реализуются по различным каналам. При этом и «набор» модулей в разных типах клеток может быть разным.

В реализацию ответа клетки на возмущающие воздействия при участии вышеприведенных модулей включены по крайней мере три эффекторные транскрипционные системы: система, интегрируемая белком p53, семейство транскрипционных факторов ядерного фактора каппа B (NF-kB), участвующих в регуляции генов белков острой фазы, поверхностных рецепторов клетки и цитокинов, и белок-активатор траскрипции AP-1.

Последние данные показывают, что, взаимодействуя с клетками, ионизирующая радиация инициирует в них компенсаторную активацию названных MAPK-сигнальных путей аналогично другим повреждающим агентам. Возникающие биосигналы играют критическую роль в контроле за клеточной выживаемостью и репопуляцией после облучения, оставаясь зависимыми от типа клеток. Некоторые из активируемых при облучении сигнальных путей относятся к тем, которые в норме являются митоген-зависимыми (например, ERK-киназный путь). Другие MAPK-сигнальные пути, возбуждаемые радиацией (JNK и p38 MAPK), как и сигналы, идущие от повреждений ДНК, включают механизмы, находящиеся ниже рецепторов смерти и прокаспаз. Экспрессия и высвобождение лигандов аутокринных факторов, таких как трансформирующий фактор роста A и фактор некроза опухоли α, могут усиливать ответы MAPK-сигнальных путей в облученных клетках и вовлекать в радиационную реакцию соседние необлученные клетки.

Контрольные вопросы

1. Как устроена система проведения сигналов от рецепторов (сенсорного звена) к генетическому аппарату клетки?

2. Какие эффекторные транскрипционные системы включены в реализацию ответа клетки на возмущающие воздействия?

3. Какое воздействие на регулярную систему клетки вызывает ионизирующая радиация?

6.4. Биологические мембраны и радиобиологическая роль прооксидантной и антиоксидантной системы клетки

Биологические мембраны, являясь главным компонентом большинства органоидов, создают по всему объему клетки плотную сеть отсеков с огромной суммарной площадью поверхности. В сочетании с текучестью липидной составляющей это делает неизбежным взаимодействие мембранных структур с продуктами радиолиза воды, участие в формировании радиационных эффектов. Одновременно во множестве участков мембран излучение инициирует цепную автокаталитическую реакцию перекисного окисления липидов.

В итоге при облучении в достаточно высоких дозах происходит деградация мембран и связанных с ними ферментных ансамблей, высвобождение ферментов из мест их специфической локализации со сдвигом обмена веществ в сторону катаболизма. Но главное последствие –

генерация сигналов для МАРК-киназных каскадов. В качестве таких сигналов могут выступать фактор(ы) роста, воспалительные цитокины, факторы стресса, в частности АФК-$O\cdot_2$, H_2O_2, $OH\cdot$, $NO\cdot$.

Интенсификация свободнорадикального окисления липидов ускоряет их кругооборот в мембранах с элиминацией легкоокисляемых фракций, липидная составляющая мембран обогащается устойчивыми к окислению молекулами. В итоге интенсивность окислительных процессов в липидах понижается и приходит в норму, знаменуя переход клетки в новое метаболическое состояние. Таким образом, окислительные превращения в липидах являются важным компонентом системы регуляции функциональной активности мембран, обеспечения запуска адаптивных реакций в клетке.

Из схемы, приведенной на рис. 6.4, очевидно, что нормальная клетка постоянно продуцирует АФК, оксид азота NO и его производное — пероксинитрит. Они возникают в процессе окислительного метаболизма при участии ферментов ксантиноксидазы, НАДН-оксидазы, альдегидоксидазы, флавинсодержащих гидролаз, цикло- и липоксигеназ, а также NO-синтаз для обеспечения нормальной жизнедеятельности.

В клетках крови фагоцитарного типа радикалы $O_2\cdot$ и $OH\cdot$ выполняют функцию защиты организма от чужеродной генетической агрессии. Однако продукция их в любых других клетках указывает на то, что образование таких радикалов не является метаболическим «шумом», а имеет позитивную биологическую функцию защиты генома, аналогичную реализуемой фагоцитами. Генерация радикальных форм кислорода активирует тирозиновые протеинкиназы и нейтрализует агрессию против клеточных органелл чужеродного генетического материала путем его инактивации и предотвращает накопление в клетке собственных макромолекул, ставших чужеродными из-за спонтанных изменений структуры.

Постоянная метаболическая продукция оксирадикалов в клетке, достигающая 10^{10} свободных радикалов на клетку в сутки, могла бы представлять потенциальную опасность для ее жизнедеятельности, будучи способной повреждать мембранные и генетические структуры ядра и митохондрий, особенно при стрессовых воздействиях, когда эта продукция значительно возрастает. Однако возникновению в клетках оксидативной катастрофы препятствует детально описанная система антиокислительной защиты. Эта система сформирована из ферментов (супероксиддисмутазы, обеспечивающей в присутствии воды дисмутацию $O\cdot_2$ в пероксид водорода; каталазы и глугатионпероксидазы — Se-содержащего энзима, разлагающих пероксид водорода до воды, других ферментов), белка церулоплазмина, связывающего избыток переходных металлов, и низкомолекулярных природных антиоксидантов — убихинонов, глутатиона, аскорбиновой кислоты, α-токоферола. Она защищает биомембраны органоидов от повреждения радикалами. Создаваемый ею антиоксидантный барьер (в сочетании с активацией репарации ДНК, апоптоза и иммунных механизмов элиминации мутировавших клеток) в условиях нормальной жизнедеятельности практически не преодолим для свободных радикалов, поскольку реальный уровень спонтанных мутаций, образуемых метаболическими АФК, на 16 порядков ниже ожидаемого от потенциальной реализации их эффекта. В тех случаях, когда содержание АФК все-таки превышает физиологические значения, реализуется их сигнальная функция в активации регуляторных сетей ответа клеток на повреждающие воздействия. Существует около 500 прямых экспериментальных доказательств этого факта. Однако при действии ионизирующей радиации супероксидный анион-радикал $O\cdot_2^-$, пероксид водорода H_2O_2, оксид азота NO выполняют как сигнальную функцию, так и роль факторов, повреждающих ДНК и отдельные звенья регуляторных каскадов.

Сигнальная функция АФК при изменении их содержания в клетке состоит в активации киназных каскадов: ERK, приводящей к высвобождению ядерного фактора каппа B (NF-κB), и JNK, вызывающей экспрессию гена опухолевого супрессорного белка p53 (контролирующего сверочные точки клеточного цикла, репарацию ДНК и запуск программы апоптоза), а также генов *PIC 1—14* (p53-inducedgene 1—14), участвующих в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза в клетке, в частности кодирующие митохондиальный белок ферредоксин, PIG3 — цитоплазматический гомолог оксидоредуктаз, NADH-хинон-оксидоредуктазу 1, белок PIG8 — модифицирующий апоптоз в опухолевых клетках.

Нерадиационные стрессовые воздействия тоже вызывают в клетках возрастание продукции АФК, часто десятикратное. В свою очередь облучение от естественного радиационного фона в дозе 0,1 Гр/год приводит к приросту мутаций на 10^{-7} на клетку в сутки. Но реализация повреждающего действия АФК, продуцируемых метаболически при нерадиационных воздействиях и возникающих в радиационно-химических реакциях, имеет определенные различия.

В первом случае АФК возникают в структурах цитоплазмы и, мигрируя, оказывают повреждающее действие и на близлежащие мембранные структуры, и на органоиды в целом, включая ядро, когда противостоящая им антиоксидантная защита оказывается неэффективной в силу исчерпания ее суммарной емкости в данном участке клетки. Это приводит к локальной дезорганизации клеточного метаболизма и может вызывать повреждения в генетическом материале, деградацию мембран, аберрации хромосом и генные мутации. Однако сколь широким бы ни

был «прорыв» таких радикалов, никогда не возникает всплеска клеточной гибели путем апоптоза и следующей за ним клинической картины, характерной для лучевой болезни.

Причина фундаментальных различий между действием метаболических радикалов и ионизирующей радиации состоит в том, что антиокислительная защита всегда стоит барьером на пути обменных радикалов (образующихся в цитоплазме) к органоидам клетки. При действии же ионизирующей радиации свободные радикалы, включая АФК, возникают во всем облучаемом объеме клетки – как в органоидах, так и в цитоплазме. Уже в момент облучения более половины радиационно-обусловленных АФК оказывается за антиоксидантным барьером и, находясь на более коротких расстояниях, чем метаболические АФК, от критических мишеней, взаимодействует с наиболее радиочувствительными биомолекулами, успевая реализовать повреждающее действие в органоидах еще до вступления в реакции с системой антиокислительной защиты. Поэтому даже на фоне активации сигнальных МАРК-каскадов, организующих ответ клеток на повреждение, наблюдаемый радиобиологический эффект оказывается зависимым от дозы облучения.

Контрольные вопросы

1. Какие свойства мембран определяют их участие в формировании радиационных эффектов?
2. Какую роль на функционирование клетки оказывает интенсификация свободнорадикального окисления липидов?
3. Какое воздействие на клетку оказывает генерация радикальных форм кислорода?
4. Как устроена и как функционирует система антиокислительной защиты клетки?
5. Какое повреждающее действие на клетку оказывают АФК?
6. В чем заключается основная причина фундаментальных различий между действием метаболических радикалов и ионизирующей радиации?

6.5. Молекулярные механизмы гиперчувствительности к действию радиации

Под гиперчувствительностью к малым дозам радиации понимают пониженный уровень гибели клеток в культуре в сравнении с прогнозируемым уровнем, предсказываемым исходя из линейно-квадратичной модели. Последующий возврат к линейно-квадратичным значениям или их превышение соответствует диапазону повышенной радиорезистентности. Таким образом, феномен гиперчувствительности заключается в том, что малые значения поглощенной дозы ионизирующей радиации могут приводить к большему эффекту, чем более высокие значения поглощенной дозы.

Гиперчувствительность наблюдают у опухолевых клеток, облученных *in vitro,* и в некоторых нормальных тканях при облучении *in vivo* (рис. 6.5). Действительно, клеточные линии практически всех опухолей человека проявляют гиперчувствительность к облучению, как правило, имеющую место при дозах менее 50 сГр. При этом у них сохраняется способность к p53-индуцированному апоптозу, с которым, по-видимому, и ассоциирована гиперчувствительность. В диапазоне 50–100 сГр, напротив, наблюдается повышение радиоустойчивости по сравнению с расчетными значениями, соответствующими линейно-квадратичной модели. При дозах свыше 100 сГр выживаемость клеток адекватно описывается линейно-квадратичным уравнением. Таким образом, в настоящее время гиперчувствительность постулируется как «реакция по умолчанию» для большинства типов клеток при дозе менее 20–30 сГр и выявляется для качественно разных типов облучения.

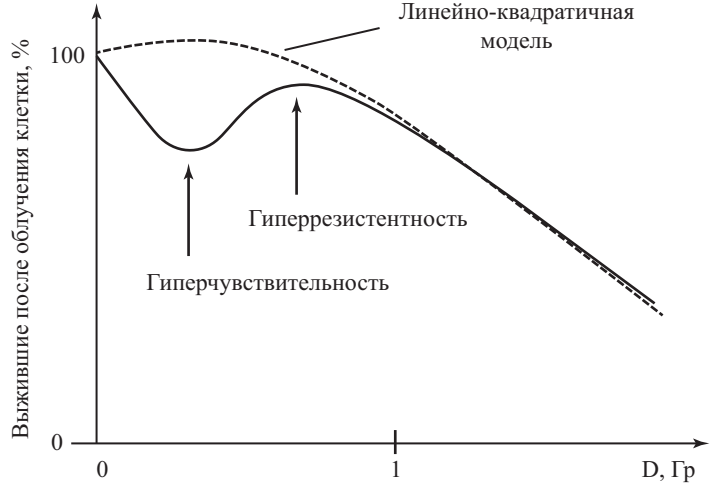

Рис. 6.5. Зависимость выживаемости клеток в культуре от дозы ионизирующей радиации

Гиперчувствительность может быть объяснена присутствием субпопуляции клеток, имеющих повышенную чувствительность в силу определенной стадии клеточного цикла или генетической предрасположенности. В свою очередь с увеличением дозы возрастает устойчивость,

поскольку начинают более эффективно индуцироваться защитные механизмы, такие как индукция репарации ДНК или подавление апоптоза.

Показано, что гиперчувствительность с последующей радиорезистентностью проявляют только клеточные субпопуляции, находящиеся во время облучения на стадии клеточного цикла G_2, тогда как клональная выживаемость субпопуляций на S- и G_1-стадиях соответствует линейно-квадратичной модели.

Предполагается, что в результате активации контрольной точки G_2 клеточного цикла активируется репарация ДНК, но только при превышении некой пороговой дозы. Ниже этой дозы клетки, находящиеся на стадии G_2, будут переходить в митоз с нерепарированными, потенциально летальными повреждениями ДНК. Таким образом, радиочувствительность клеток в данном случае связана не с первоначальным количеством двухцепочечных разрывов и даже не с репарационной кинетикой, а с количеством остаточных, нерепарированных двухцепочечных разрывов.

Так, в случае искусственного подавления пролиферации культуры клеток в течение некоторого времени после облучения клональная выживаемость повышается. Это может быть связано с тем, что для индукции эффективной репарации повреждений требуется время. Предобработка ингибитором биосинтеза белка циклогексимидом, предшествующая облучению, приводит к появлению гиперчувствительности без последующей повышенной радиорезистентности. Напротив, чувствительность снижается или исчезает при предобработке культуры клеток H_2O_2.

В полном соответствии с концепцией порога репарации предоблучение в дозах 20 или 100 сГр (за несколько часов до основного воздействия) снимает гиперчувствительность, тогда как доза 5 сГр оказывается неэффективной. Таким образом, очевидна взаимосвязь между гиперчувствительностью и адаптивным ответом: адаптивный ответ можно рассматривать как подавление гиперчувствительности. В то же время, если циклогексимид присутствует как на этапе предобработки H_2O_2, так и при облучении, адаптивный ответ исчезает, но имеют место гиперчувствительность и последующая повышенная радиорезистентность. Возможно, что адаптивный ответ является следствием гиперчувствительности – гибели на чувствительной стадии G_2 тех поврежденных клеток, в которых не индуцировалась задержка клеточного цикла для репарации своей ДНК. При восстановлении способности синтеза белка и возобновлении клеточного цикла культуры вновь проявляют гиперчувствительность и индуцированную радиорезистентность.

Очевидно, что при увеличении дозы облучения смена гиперчувствительности на радиорезистентность является следствием активации «индуцибельного» механизма ответа (C_2/M проверочной точки клеточного цикла). Обнаружены две различные G_2/M проверочные точки клеточного цикла. Существует ATM-независимая отсроченная задержка на стадии G_2/M, которая наблюдается только спустя несколько часов после облучения и является зависимой от дозы. Другая проверочная точка G_2/M активируется сразу после облучения и не индуцируется при дозах менее 30 сГр. Кроме того, она является ATM-зависимой. По-видимому, гиперчувствительность связана с неспособностью индуцировать именно ранний G_2/M ответ. Взаимосвязь гиперчувствительности и репарации ДНК подтверждается многочисленными фактами.

Гиперчувствительность также имеет место при нестабильности концевых участков хромосом – теломер. Врожденный дискератоз у человека – заболевание, связанное со снижением уровня теломеразной активности в половых и стволовых клетках, – приводит к ускоренному укорочению теломер и гиперчувствительности к ИИ. Мыши, теломеры которых на 40% короче нормы, сверхчувствительны к γ-излучению вследствие индуцируемых нарушений в желудочно-кишечном тракте, лимфоидных органах и почках. У них наблюдается повышенный уровень хромосомных повреждений и апоптоза по сравнению с облученными особями дикого типа. Таким образом, функция теломер является одной из детерминант радиочувствительности организма.

Так зачем возникла система репарации ДНК, имеющая порог повреждения? Возможно, для того чтобы обеспечить эффективную элиминацию немногочисленных клеток, поврежденных малыми дозами ИИ, снизив таким образом риск возникновения мутаций при самой репарации (по типу негомологичного воссоединения концов хромосом) и вероятность выживания нерепарированных клеток.

В целом гиперчувствительность к малым дозам отражает различия ДНК-сигналинга и репарации при очень низких дозах облучения по сравнению со средними или большими. В этой связи интересно сопоставление данного явления с другими эффектами малых доз. Имеет место тесная связь гиперчувствительности с адаптивным ответом. Следует еще отметить, что важную роль при гиперчувствительности к малым дозам радиации играют межклеточные контакты, что сближает данное явление с эффектом свидетеля. В то же время, как и другие эффекты малых доз радиации, гиперчувствительность проявляется не всегда (табл. 6.1).

Таблица 6.1. **Механизмы гиперчувствительности и повышенной радиорезистентности клеток**

Доза, сГр	Эффект	Механизм
0,01—30	Гиперчувствительность	Единичные нерепарируемые двухцепочечные разрывы ДНК, вызывающие митотическуто гибель клетки и (или) p53-зависимый апоптоз
30—100	Повышенная радиорезистентность	Индукция ранней ATM-зависимой проверочной точки G_2/M стадии клеточного цикла
> 1 00	Линейно-квадратичная зависимость доза – эффект	Гибель клетки прямо пропорциональна дозе облучения (повреждению)

Таким образом, согласно современным представлениям при облучении в дозах, не превышающих 30 сГр, имеет место повышенная частота гибели клеток (гиперчувствителыюсть), связанная с образованием нерепарированных двухцепочечных разрывов ДНК. При возрастании дозы в диапазоне 30–100 сГр наблюдается повышенная радиорезистентность клеток. Дальнейшее увеличение дозы приводит к эффектам, полностью соответствующим линейно-квадратичной модели выживаемости.

Однако до сих пор остается невыясненным следующий факт: каким образом феномен гиперчувствительности, обнаруженный в культурах большинства типов клеток, связан с интегральными показателями жизнеспособности организмов, для которых также выявляется гиперчувствительность к малым дозам излучений.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается феномен гиперчувствительности?
2. Какой график, отражающий зависимость выживаемости (в процентах) клеток в культуре от дозы ионизирующей радиации (Гр), можно начертить?
3. Чем обусловлена гиперчувствительность клеточных популяций на стадии G_2?
4. В чем заключается взаимосвязь между гиперчувствительностью и адаптивным ответом?
5. Чем обусловлена смена гиперчувствительности на радиорезистентность при увеличении дозы облучения?
6. Нестабильность каких структур клетки приводит к гиперчувствительности? В каких аномалиях она выражается?
7. В каких дозах при облучении наблюдается гиперчувствительность и с чем она связана согласно современным представлениям?

Глава 7

РАДИОБИОЛОГИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

7.1. Основы видовой и индивидуальной радиочувствительности

Вскоре после открытия биологического действия ионизирующих излучений было установлено, что дозы излучения, приводящие к гибели, для разных объектов живой природы различаются в очень широких пределах. Лимфоциты, к примеру, гибнут при дозах в 1–3 Гр, а одноклеточные организмы выдерживают облучение при дозах 1000 Гр. Можно утверждать, что каждому биологическому объекту свойственна своя мера чувствительности к действию ионизирующей радиации, которая в радиобиологии именуется *радиочувствительностью*.

Примером крайне низкой радиочувствительности могут служить бактерии, обнаруженные в канале ядерного реактора, где мощность дозы достигает 10^5 Гр в сутки. Они способны жить и размножаться в данных условиях, за что получили название «микрококк радиорезистентный» (Micrococcusradiodurens), хотя для большинства других микроорганизмов их полулетальные дозы находятся в пределах 100–450 Гр. Так, Micrococcussodensis является примерно в 25 раз более радиочувствительным. Для E. coli полулетальная доза составляет 50 Гр, а для инфузорий и амеб – 3000–5000 Гр. Данные примеры показывают, что существуют значительные различия в радиочувствительности среди разнообразных простейших организмов.

Кроме того, даже в одном организме различные клетки и ткани очень сильно различаются по радиочувствительности, и наряду с чувствительными (кроветворная система, эпителий слизистой оболочки тонкого кишечника) имеются устойчивые ткани (мышечная, нервная, костная), которые принято называть радиорезистентными.

На сегодняшний день проблема радиочувствительности занимает центральное место в радиобиологии, поскольку познание природы различий естественной радиочувствительности и радиорезистентности и механизмов ее регуляции не только имеет теоретическое общебиологическое значение, но и обещает важные практические результаты, в первую очередь в области искусственного управления лучевыми реакциями

тканей, т.е. возможности их ослабления, если речь идет о защите организма, или, наоборот, селективного (локального) усиления – при облучении злокачественных опухолей.

Поэтому в интерпретации термина «радиочувствительность» должна быть предельная ясность. В литературе можно встретить рекомендацию различать понятия радиочувствительности и радиопоражаемости как отражающие якобы разные биологические явления. Следуя этой рекомендации, одна и та же ткань, например нервная, является одновременно и радиочувствительной, и радиоустойчивой. Это вносит определенную путаницу и опасность неверной интерпретации результатов, поэтому, когда речь идет о сравнительной радиочувствительности биологических объектов, то понятие *радиочувствительности* является синонимом их *радиопоражаемости*. Альтернативными им являются понятия *радиоустойчивости* и *радиорезистентности*.

При сравнении радиочувствительности совершенно обязательно использовать адекватные методы и критерии.

На первый взгляд кажется, что радиочувствительность может характеризоваться любой регистрируемой реакцией на облучение вне зависимости от ее значения для жизнеспособности определенного объекта. Тогда и сравнение различных объектов следует производить по степени проявления данной реакции. Между тем многие лучевые реакции строго специфичны для определенных объектов (в частности, для определенных тканей и систем) и отсутствуют в других.

Например, такая универсальная реакция клеток на облучение, как задержка деления, легко выявляется в активно пролиферирующих тканях, но по вполне понятным причинам не может быть обнаружена в тканях, где клеточное деление выражено слабо или отсутствует.

Сравнительными показателями радиочувствительности не могут служить также разнообразные функциональные реакции, являющиеся проявлением высокодифференцированных свойств отдельных тканей, органов и систем. К их числу относятся активация и ингибирование специфического метаболизма, продукции определенных ферментов, гормонов и других веществ.

Обязательным требованием к используемому критерию является его строгая количественная зависимость от дозы излучения. В качестве такого наиболее интегрального критерия радиочувствительности обычно используют либо непосредственно степень снижения выживаемости изучаемых объектов в результате облучения в определенных дозах, либо такие количественные показатели поражения, которые в данном диапазоне доз однозначно связаны определенным отношением с выживаемостью.

Наиболее часто с этой целью используют такие количественные величины, как $ЛД_{50}$ или $ЛД_{100}$, характеризующие дозу излучения, вызывающую гибель соответственно 50 или 100% объектов за различное время после облучения в зависимости от вида облученных организмов. Величины $ЛД_{50}$, как будет рассмотрено далее, в природе различаются довольно значительно не только между отдельными таксономическими рядами, но и внутри них и даже в пределах одного вида.

Имеется множество данных, указывающих на широкий *видовой* диапазон различий по радиочувствительности в природе (табл. 7.1).

Таблица 7.1. **Диапазон различий в радиочувствительности к дозам γ-излучения ($ЛД_{50}$) в природе**

Объект	$ЛД_{50}$, Гр
Овцы	1,5–2,5
Собаки	2,5–3,0
Люди	2,5–3,5
Мыши	6,5–15,0
Крысы	7,0–9,0
Птицы	8,0–20,0
Рыбы	8,0–20,0
Насекомые	10,0–100,0
Растения	10,0–1500,0

Таким образом, термином «радиочувствительность» обозначают величину, обратную отношению величин доз ионизирующего излучения, вызывающих количественно равные эффекты одного типа в сравниваемых биологических системах.

Из рис. 7.1 видно, что существует определенная закономерность изменения радиочувствительности при сравнении различных таксономических групп организмов: теплокровные > холоднокровные > беспозвоночные > простейшие. Следовательно, радиочувствительность возрастает по мере усложнения организации биологических объектов.

Наблюдаемые значительные различия в радиочувствительности у представителей различных таксономических групп обусловлены не физическими особенностями поглощения энергии ионизирующих излучений, а в первую очередь биологическими особенностями объектов, такими как:

- характер их структурной и функциональной организации;
- различия в адаптивных и регенераторных возможностях;
- специфичность протекания начальных реакций первичных радиационных повреждений;
- интенсивность метаболических и пролиферативных процессов и т.д.

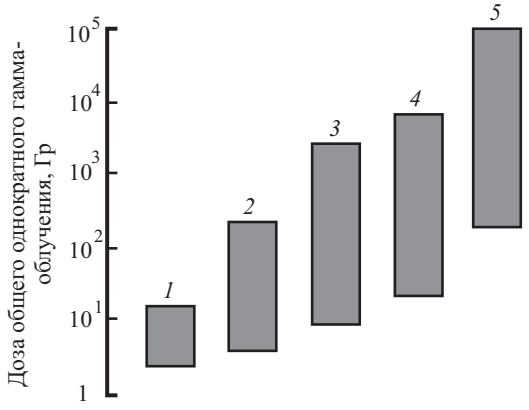

Рис. 7.1. Ориентировочные значения размаха радиочувствительности ($ЛД_{100}$) у организмов, принадлежащих к различным филогенетическим группам:
1 – млекопитающие; *2* – другие позвоночные; *3* – беспозвоночные; *4* – растения; *5* – микроорганизмы

Кроме того, степень радиочувствительности может значительно варьировать в пределах одного вида, т.е. существует такое понятие, как *индивидуальная радиочувствительность организмов*. При этом для данного индивидуума она зависит от *возраста, пола, физиологического состояния биологического объекта* и ряда других факторов.

Молодые и старые организмы более радиочувствительные по сравнению со зрелыми (рис. 7.2). В пределах одного организма клетки и ткани сильно различаются по своей радиочувствительности. Следовательно, чтобы правильно оценить последствия облучения организма, необходимо проанализировать последствия его облучения на различных уровнях – клеточном, тканевом, органном, системном, организменном.

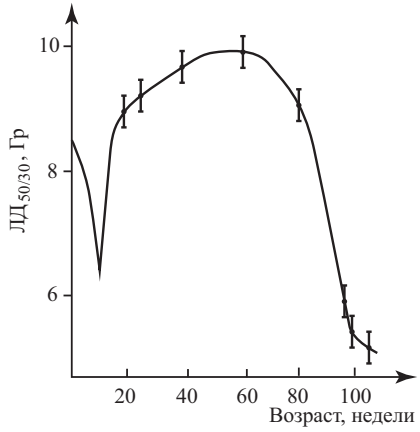

Рис. 7.2. Значения величины летальной дозы $ЛД_{50/30}$ для мышей различного возраста

Еще в 1906 г. И. Бергонье и Л. Трибондо показали, что радиочувствительность клеток прямо пропорциональна их пролиферативной активности и обратно пропорциональна степени дифференцировки составляющих ее клеток. Именно этим можно объяснить

повышенную радиочувствительность молодых особей, клетки которых активно делятся в процессе роста и развития организма. Интересно, что эта общебиологическая закономерность наблюдается не только у млекопитающих, но и у других организмов (рис. 7.3), что используется в практических целях, например при борьбе с вредными насекомыми.

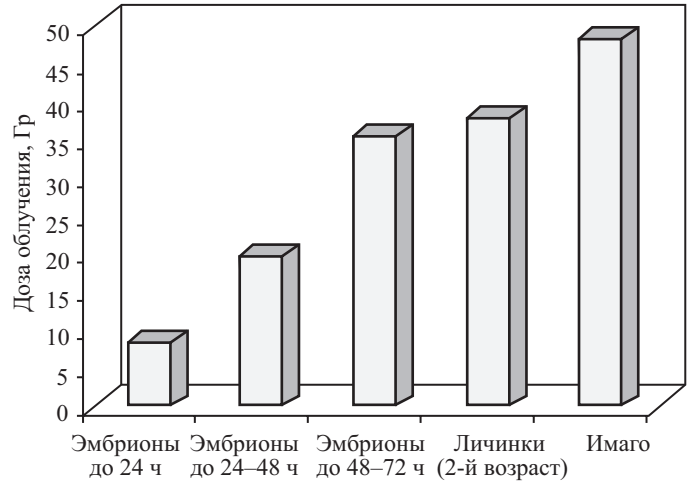

Рис. 7.3. Значения $ЛД_{50}$ острого γ-облучения для колорадского жука в разные периоды развития

Физиологическое (например, сон, бодрость, усталость, беременность) или патофизиологическое (хронические заболевания, ожоги) состояние организма также будут влиять на индивидуальную радиочувствительность организма.

Кроме того, мужской организм обладает большей радиочувствительностью по сравнению с женским организмом.

На тканевом уровне также выполняется правило (закон) Бергонье – Трибондо. В организме наиболее радиочувствительными будут ткани, имеющие резерв активно размножающихся малодифференцированных клеток, например кроветворная ткань, гонады, эпителий тонкого кишечника. Наименее радиочувствительными, наиболее радиорезистентными будут высокоспециализированные малообновляющиеся ткани, например мышечная, костная, нервная.

На органном уровне радиочувствительность зависит не только от радиочувствительности тканей, составляющих данный орган, но и от их функций.

Контрольные вопросы

1. Какое определение можно дать термину «радиочувствительность»?
2. Какие примеры, показывающие существование значительных различий в радиочувствительности среди разнообразных простейших организмов, можно привести?
3. Какие структуры в организме животного принято называть радиорезистентными?
4. Какой критерий обычно используют в качестве наиболее интегрального критерия радиочувствительности?
5. Какие примеры, показывающие наличие широкого видового диапазона различий радиочувствительности в природе, можно привести?
6. Какой ряд, характеризующий закономерность изменения радиочувствительности различных таксономических групп организмов, можно привести?
7. Какими особенностями обусловлены значительные различия в радиочувствительности различных таксономических групп организмов?
8. От каких факторов зависит индивидуальная радиочувствительность организмов?
9. Какую закономерность обнаружили в 1906 г. Бергонье и Трибондо?
10. От каких факторов зависит радиочувствительность на различных уровнях организации живых организмов?

7.2. Лучевые реакции отдельных органов и тканей

Рассмотрим воздействие радиационного фактора на основные органы и ткани животных и человека.

Семенники. В них постоянно идет размножение сперматогониев, которые обладают высокой радиочувствительностью, а сперматозоиды (зрелые клетки) являются более радиорезистентными. Уже при дозах облучения свыше 0,15 Гр (0,4 Гр/год) происходит клеточное опустошение. При облучении в дозах 3,5–6,0 Гр (2 Гр/год) возникает постоянная стерильность.

Яичники. В яичниках взрослой женщины содержится популяция незаменяемых ооцитов (их образование заканчивается в ранние сроки после рождения). Воздействие однократного облучения в дозе 1–2 Гр на оба яичника вызывает *временное бесплодие* и прекращение менструаций на 1–3 года.

При остром облучении в диапазоне 2,5–6 Гр развивается *стойкое бесплодие*. Это связывают с тем, что образование женских половых клеток заканчивается в ранние сроки после рождения и во взрослом состоянии яичники не способны к активной регенерации. Поэтому, если облучение вызывает гибель всех потенциальных яйцеклеток, то плодовитость утрачивается необратимо.

Орган зрения. Возможны два типа поражения глаз: воспалительные процессы в конъюнктиве и склере (при дозах 3–8 Гр) и катаракта (при дозах 3–10 Гр). У человека катаракта появляется при облучении в дозе 5–6 Гр. Наиболее опасным является нейтронное облучение.

Органы пищеварения. Наибольшей радиочувствительностью обладает тонкий кишечник. Далее по степени снижения радиочувствительности следуют полость рта, язык, слюнные железы, пищевод, желудок, прямая и ободочные кишки, поджелудочная железа, печень.

Сердечно-сосудистая система. В сосудах большей радиочувствительностью обладает наружный слой сосудистой стенки, что объясняется высоким содержанием коллагена. Сердце считается радиорезистентным органом, однако при локальном облучении в дозах 5–10 Гр можно обнаружить изменения миокарда. При дозе 20 Гр отмечается поражение эндокарда.

Органы выделения (почки). Почки достаточно радиорезистентны. Однако облучение почек в дозах более 30 Гр за 5 недель может привести к развитию хронического нефрита (это может быть лимитирующим фактором при проведении лучевой терапии опухолей органов брюшной полости).

Контрольные вопросы

1. Какие изменения и при каких дозах происходят в семенниках?
2. Какие изменения и при каких дозах происходят в яичниках взрослой женщины?
3. Какие возможны типы поражений глаз и при каких дозах они происходят?
4. Какой орган пищеварения наиболее радиочувствителен и почему?
5. Какие поражения сердечно-сосудистой системы и при каких дозах происходят при радиационном поражении?
6. Какой фактор может быть лимитирующим при проведении лучевой терапии? Почему?

7.3. Клеточная радиочувствительность

Клетки представляют собой основные ячейки жизни, в которых формируются начальные эффекты лучевых воздействий, приводящие к поражениям, проявляющимся позднее на более высоких уровнях биологической организации – тканевом, органном, системном, организменном. Поэтому в радиобиологии особое внимание уделяют процессам, развивающимся после облучения именно в клетках.

В живой клетке постоянно осуществляется обмен веществ с внешней средой, между отдельными внутриклеточными структурами. Молекулярные повреждения, возникшие в клетках на начальных стадиях

действия ионизирующих излучений, изменяют ход обменных процессов, осуществляющихся при участии поврежденных структур. Поскольку локализация и характер первичных повреждений в той или иной молекулярной структуре клетки носят в значительной степени вероятностный характер, весьма разнообразны и связанные с ними изменения метаболизма.

Нарушение метаболических процессов в свою очередь приводит к увеличению выраженности молекулярных повреждений в клетке. Этот феномен получил наименование биологического усиления первичного радиационного повреждения. Однако наряду с этим в клетке развиваются и репарационные процессы, следствием которых является полное или частичное восстановление структур и функций.

Клеточный радиобиологический феномен анализируется со времени открытия рентгеновских лучей и радиоактивности. За этот период накоплен обширный экспериментальный материал о характере морфологических и биохимических изменений в облученной клетке, изучены кинетические закономерности развития лучевого поражения, проведен количественный анализ гибели клеток в облученной популяции. В настоящее время ведутся интенсивные исследования, посвященные анализу первичных физико-химических процессов, происходящих в облученной клетке.

Показано, что на клеточном уровне радиочувствительность зависит от таких факторов, как:

- активность репарирующих систем;
- уровень сульфгидрильных групп;
- уровень радиопротекторов;
- уровень антиоксидантных систем и т.д.

Задача современной радиационной биологии состоит в исследовании центрального звена – последовательности процессов, протекающих с момента возникновения немногочисленных начальных повреждений до возникновения тестируемых биологических эффектов, включая гибель клетки. Для этого используется широкий арсенал физико-химических, биофизических и биохимических методов анализа, оригинальные подходы, основанные на фундаментальных физических концепциях о взаимодействии фотонов с веществом, разнообразные модельные системы: изолированные молекулы, различные многокомпонентные системы, субклеточные органоиды, культивируемые клетки различных тканей.

Контрольные вопросы

1. Почему в радиобиологии особое внимание уделяют процессам, развивающимся после облучения именно в клетках?

2. Какие изменения возникают в клетках на начальных стадиях действия ионизирующих излучений?
3. От каких факторов зависит клеточная радиочувствительность?
4. В чем заключается задача современной радиобиологии? Какие подходы используются для ее решения?

7.4. Молекулярные и биохимические основы наиболее значимых радиационно-медицинских эффектов

Радиационно-медицинскими называют радиационные эффекты, проявляющиеся у человека нарушениями здоровья. По патогенетическим критериям они подразделяются на соматические и генетические, по времени проявления после облучения – на ближайшие, отсроченные и отдаленные. Согласно современным представлениям ближайшими последствиями являются острая и хроническая лучевая болезнь и радиационная гибель организма, а также эмбриотоксический и тератогенный эффекты как следствие внутриутробного облучения. Лучевая болезнь относится к соматическим эффектам нестохастического (детерминированного) характера. Такие эффекты возникают при действии радиации в определенной дозе у каждой облученной особи. Для них характерна зависимость тяжести проявления от дозы облучения.

В отличие от стохастических эффектов, для которых любое приращение дозы над природным радиационным фоном может повышать вероятность их появления, детерминированные эффекты становятся регистрируемыми только выше определенного уровня доз, т.е. имеют порог вследствие наличия механизмов элиминации радиационных повреждений на молекулярном и клеточном уровнях, регенерации и компенсации – на органном и организменном уровнях.

Отсроченные эффекты проявляются по выздоровлении от ранних клинических проявлений острого поражения атрофией и склерозированием органов, подвергавшихся острому облучению в значительных дозах. К отдаленным последствиям облучения относят клинические проявления радиационного канцерогенеза и радиационное старение. При этом радиационный канцерогенез рассматривают как генетический эффект, имеющий стохастический (вероятностный) характер, поскольку зависимость его проявления от дозы излучения существует не для тяжести процесса, а для вероятности возникновения у каждой особи. Другими словами, на уровне отдельного биообъекта (клетка, организм) ему свойственно проявление по принципу «есть – нет» («все или ничего») и отсутствие порога на графике зависимости частоты проявления от дозы излучения.

К числу генетических последствий действия излучений относят также мутации, к которым принадлежат уже упоминавшиеся генные (точковые) мутации и хромосомные аберрации в соматических и половых клетках. Эти изменения в генетическом материале соматических клеток надежно связаны с дозой облучения, лишь когда она превышает 0,1 Гр, не проявляются каким-либо установленным клиническим ущербом и пока рассматриваются в радиобиологии только в качестве основы биодозиметрии при радиационных авариях. Их возникновение в половых клетках, согласно данным по пережившим атомные бомбардировки в Японии, после однократного облучения даже в умеренных дозах служит причиной ничтожных вредных последствий для здоровья последующих поколений. Эти последствия с трудом выявляются из «шумов» естественно встречающихся мутационных эффектов с помощью самых изощренных эпидемиологических методик последних пяти десятилетий.

Экспериментальные данные на животных более отчетливы и указывают на появление связанных с полом облученных родителей нарушений развития потомства 1-го и 2-го поколений.

Феномен лучевой болезни рассматривается как радиационно-индуцированные тромбоцито-, лимфоцито-, лейкоцитопатии с выраженными явлениями иммунодефицита, нарушениями гомеостаза и возможным исходом в летальный эффект, вероятность которого возрастает с увеличением дозы радиации от сублетальной до абсолютно летальной. Клеточную основу его составляет нарушение кинетики клеточных популяций. Это нарушение проявляется клеточным опустошением критических органов (костный мозг, слизистая тонкого кишечника) вследствие радиационно-обусловленной гибели части клеток-предшественниц, включая стволовые, естественного отмирания зрелых клеток и нарушения пролиферации оставшихся и сменяется репопуляцией органов в результате пролиферации выживших стволовых клеток, коммитирования ранних предшественников зрелых клеток по направлениям дифференцировки и размножения клеточных клонов.

Контрольные вопросы

1. По каким критериям подразделяются радиационно-медицинские эффекты?
2. В чем выражаются ближайшие радиационно-медицинские эффекты согласно современным представлениям?
3. Чем отличаются стохастические радиационные эффекты от детерминированных?
4. Каковы генетические последствия действия ионизирующих излучений?
5. В чем заключаются причина и последствия лучевой болезни?

Глава 8

НЕМИШЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ

8.1. Радиационно-индуцированная нестабильность генома

Первоначально постулировалось, что клетка наследует только те изменения, которые образовались в ДНК до вступления в первый митоз после облучения. Исследователи исходили из того, что повреждения ДНК фиксируются в мутации в процессе первого после облучения раунда репликации ДНК или вследствие ошибочной репарации первоначальных радиационно-индуцированных повреждений.

Однако впоследствии в экспериментах на клеточных культурах *in vitro* стали накапливаться свидетельства о возникновении нестабильного состояния генома у потомков облученных клеток, которые не подвергались непосредственному облучению. Более того, было доказано, что в ряду митозов спектр хромосомных аберраций, например, может меняться не только количественно (за счет элиминации наиболее грубых генетических аномалий вследствие гибели носителей), но и качественно – ряд мутаций возникал *denovo* без дополнительных мутационных воздействий. Общим для всех исследований было подтверждение факта, что общее количество мутаций остается существенно повышенным по сравнению с контрольным уровнем.

Сегодня этот феномен известен как радиационно-индуцированная генетическая нестабильность. Он характеризуется не только общим повышенным уровнем мутаций, но и дестабилизацией хромосом, гибелью клеток и высоким риском опухолевой трансформации. Индуцировать состояние нестабильности может как редко-, так и плотноионизирующее излучение, т.е. этот феномен с биологической точки зрения является достаточно универсальным.

Генетическая нестабильность может рассматриваться как один из отсроченных эффектов радиационного воздействия, который регистрируется у потомков облученных клеток в течение многих поколений. Учитывая ранее упоминавшийся феномен Хейфлика, можно констатировать, что для многоклеточных организмов такой «отпечаток» может сохраняться на протяжении всей жизни, т.е. у лиц, пострадавших от воздействия ИИ, биологические эффекты такого рода могут сохраняться (и проявляться) на протяжении всего оставшегося периода жизни.

Обычно индукция геномной нестабильности имеет место как следствие острого облучения в дозах 2–12 Гр. Однако имеются сведения об индукции генетической нестабильности облучением в малых (до 0,1 Гр) дозах.

Генетическая нестабильность может быть зафиксирована в экспериментах не только *in vitro*, но и *in vivo*. Так, облучение рентгеновскими лучами или нейтронами эмбрионов мыши на стадии зиготы или двух бластомеров приводит к увеличению частоты аберраций в первом, втором и третьем следующих за облучением митозах. Облучение взрослых животных индуцирует продолжительную генетическую нестабильность в клетках эпителия молочной железы. А ведь уже хорошо известно, что последствием генетической нестабильности *in vivo* является повышенный риск опухолевой трансформации соматических клеток.

Несмотря на то что генетическая нестабильность является одним из наиболее интенсивно исследуемых отсроченных эффектов облучения, на сегодняшний день нет единого объяснения причин ее возникновения. Предполагается, что он представляет собой универсальную реакцию генома на любое неблагоприятное воздействие, нарушающее интегральную целостность генома. Приведем наиболее хорошо изученные на сегодняшний день механизмы индуцированной генетической нестабильности:

- дисфункция обменных биохимических процессов в митохондрии, ведущая к перманентному увеличению уровня активных форм кислорода;
- крупные изменения структурной организации хроматина как мутационной, так и эпигеномной природы;
- нарушение функции теломер или их полная утрата и образование так называемых липких концов;
- генетические изменения, обусловленные встраиванием генов ретровирусов;
- активность мобильных генетических элементов.

Как удалось выяснить группе американских исследователей под руководством В.Ф. Моргана, существуют веские доказательства участия свободных радикалов в формировании радиационно-индуцированной генетической нестабильности.

Во-первых, повышенный уровень активных форм кислорода часто наблюдается в генетически не стабильных клонах. Во-вторых, обработка клеток веществами – перехватчиками свободных радикалов снижает частоту индукции геномной нестабильности после облучения. По-видимому, увеличение уровня АФК в клетках – носителях геномной нестабильности происходит благодаря их усиленной выработке в митохондриях, а также за счет снижения активности супероксиддисмутазы, ответственной за их инактивацию.

Полагают, что физиологическая дисфункция митохондрий в генетически не стабильных клетках может быть основной причиной хронического окислительного стресса, который сам по себе является фактором дестабилизации генома. Однако данный механизм, вполне разумно объясняющий факт геномной нестабильности в отдельно взятой соматической клетке, не объясняет существование факта наследственной передачи нестабильного фенотипа потомству необлученных клеток.

Хорошо известно, что индуцировать генетическую нестабильность может не только ИИ, но и многие другие ДНК-повреждающие факторы. Тот факт, что радиационно-индуцированная генетическая нестабильность проявляется на протяжении длительного периода после облучения, предполагает наличие механизма, с помощью которого первоначальные повреждения ДНК «запоминаются» выжившими после облучения клетками.

Предполагают, что неправильная репарация радиационно-индуцированых двунитевых разрывов ДНК может привести к образованию нелетальных, но потенциально не стабильных хромосомных участков, передаваемых по наследству многие поколения после облучения. Эти нестабильные сайты могут активироваться и проявляться в форме отсроченных во времени повреждений ДНК. Эта гипотеза получила и экспериментальное подтверждение. В частности, было доказано, что наличие крупных делеций, представляющих потенциально не стабильные участки, в локусе гена HPRT, кодирующего фермент гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазу, Х-хромосомы, способствует высокому уровню индукции отсроченной хромосомной нестабильности.

Возможно, что потенциально не стабильные участки, возникающие в одной хромосоме, могут оказывать дестабилизирующее действие и на геном в целом. Указанное предположение представляется весьма логичным – нарушение интегральной целостности генома, складывавшееся в ходе эволюции на протяжении тысячелетий и позволившее геному работать как единому механизму, при появлении таких участков нарушается, а становление нового стабильного состояния сопровождается множественными переходными формами, которые и проявляются в ряде «нестабильных» поколений. Например, в экспериментах на дрозофиле было обнаружено увеличение уровня индукции рецессивных летальных мутаций в необлученных хромосомах яйцеклеток, оплодотворенных облученными спермиями.

Для проверки роли отдельной хромосомы в формировании генетической нестабильности облученную хромосому человека трансплантировали в необлученную клетку мыши. Показано, что облученная хромосома *per se* нестабильна даже в необлученном окружении. Для определения триггера отсроченной хромосомной нестабильности авторы

проанализировали хромосомные аберрации и обнаружили, что облученная хромосома имеет повышенную частоту слияния теломерных концов. Отсюда возникло предположение, что облучение не оказывает прямого влияния на теломеры, но опосредует их дисфункцию, выступающую триггером отсроченной нестабильности.

Предполагают, что в формировании геномной нестабильности могут быть задействованы и механизмы эпигенетической природы. Это, в частности, подтверждается тем обстоятельством, что на протяжении более 20 пассажей после облучения сохраняется дисрегуляция метилирования CpG-островков в кератиноцитах человека линии HPV-G.

Явление радиационно-индуцированной генетической нестабильности также может быть обусловлено активностью мобильных генетических элементов. В отличие от непосредственных повреждений ДНК, которые устраняются в процессе репарации или закрепляются в виде стабильных мутаций, активация мобильных генетических элементов может привести к нескольким циклам транспозиций, вызывать образование нестабильных мутаций и способствовать многократному увеличению повреждений ДНК после действия ИИ. В поддержку роли мобильных элементов в формировании геномной нестабильности свидетельствует факт их незначительного содержания в геноме некоторых радиоустойчивых организмов. Это подтверждает большую роль индуцированной транспозиции мобильных генетических элементов в процессе дестабилизации генома, а возможность множественных транспозиций может послужить объяснением ее сохранения на протяжении многих клеточных поколений.

Таким образом, анализ приведенной выше информации позволяет выделить два основных механизма формирования пострадиационной генетической нестабильности – митохондриальный и хромосомный (рис. 8.1).

Дисфункция митохондрий после облучения приводит к постоянному повышению уровня активных форм кислорода и состоянию окислительного стресса, а в хромосомах ИИ вызывает изменения, которые не проявляются сразу, а ведут к повышенному уровню мутаций и хромосомных перестроек в последующих поколениях облученных клеток.

Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность может индуцироваться не только облучением, но и при культивировании клеток на среде, собранной с облученных клеточных культур. Этот факт подчеркивает важную роль в формировании радиационного ответа не только внутри-, но и внеклеточных факторов, а также напрямую связывает радиационно-генетическую нестабильность с эффектом «свидетеля».

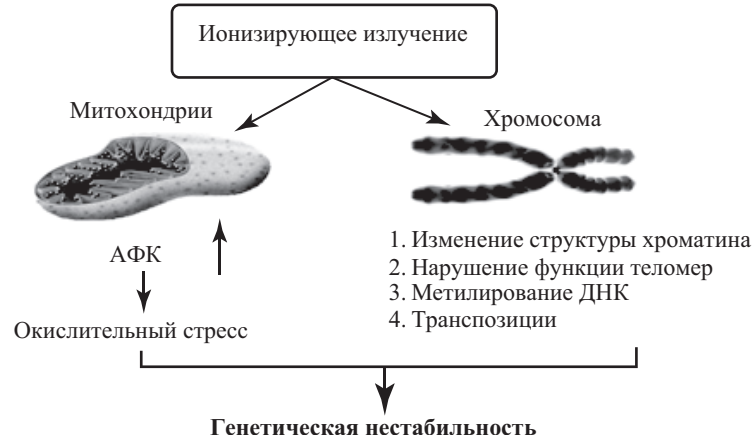

Рис. 8.1. Митохондриальный и хромосомный механизмы формирования радиационно-индуцированной генетической нестабильности

Контрольные вопросы

1. Может ли возникнуть нестабильное состояние генома у потомков облученных клеток?
2. Чем характеризуется феномен радиационно-индуцированной генетической нестабильности? При облучении какими дозами данный феномен возникает?
3. Какие наиболее хорошо изученные на сегодняшний день механизмы индуцированной генетической нестабильности можно привести?
4. Какие существуют доказательства участия свободных радикалов в формировании радиационно-индуцированной генетической нестабильности?
5. К чему может привести неправильная репарация радиационно-индуцированных двунитевых разрывов ДНК?
6. Могут ли потенциально не стабильные участки, возникающие в одной хромосоме, оказывать дестабилизирующее действие на геном в целом? Какие аргументы можно привести?
7. Какую роль могут играть мобильные элементы в формировании радиационно-индуцированной геномной нестабильности?
8. Какую схему, иллюстрирующую два основных механизма формирования пострадиационной генетической нестабильности, можно начертить?

8.2. Эффект «свидетеля»

Традиционно считалось, что биологические эффекты ИИ возникают в облученных клетках как результат прямого поражения ДНК. Это означало, что:

- биологические эффекты имеют место только в облученных клетках;

• прохождение излучения через ядро клетки является обязательной предпосылкой для возникновения биологической реакции;

• ДНК является основной молекулой-мишенью в клетке.

Однако со временем появились доказательства существования и немишенных эффектов излучения, т.е. эффектов в клетках, которые обусловливали появление генетических аномалий, таких как мутации, хромосомные аберрации и изменения в экспрессии генов, которые сами не подвергались прямому радиационному воздействию. В этом случае сигналы повреждения передаются от клетки к клетке преимущественно через щелевидные контакты, а генетические эффекты, наблюдавшиеся в клетках-«свидетелях», возникают в результате активации окислительного стресса. Обсуждается также возможное влияние таких немишенных эффектов радиации на биологический ответ клеток тканей и органов при воздействии на них излучений в малых дозах.

Долгие годы в радиобиологии полностью доминировала точка зрения, согласно которой эффекты радиации следовало изучать непосредственно в облученных клетках. Кроме того, по мнению ведущих в те годы исследователей, все эффекты сводились к последствиям нерепарированных или неправильно репарированных повреждений ядерной ДНК при непосредственной ионизации или при взаимодействии ДНК с продуктами радиолиза воды. Эффекты в ядрах, непосредственно не подверженных ИИ, как правило, не рассматривались и, более того, считались просто невозможными. Однако в последние десятилетия произошла смена основной парадигмы радиобиологии, и немишенные эффекты, среди которых и радиационно-индуцированный эффект «свидетеля», заняли свое законное место как в теории, так и в экспериментальных исследованиях.

В 1974 г. А. Брукс инъецировал особям китайского хомячка небольшое количество плутония, который концентрируется в определенных частях печени. При этом анализ радиационно-индуцированных повреждений хромосом показал увеличение цитогенетических повреждений во всей печени вне зависимости от локального распределения дозы, которая тем больше, чем ближе находится клетка к радиоактивной частице. Данные были интерпретированы таким образом: все клетки печени имели риск подвергнуться индукции хромосомных повреждений, несмотря на то что только малая фракция клеток органа была подвержена собственно прямому радиационному воздействию.

Установлено что при облучении монослоя культивируемых клеток α-частицами, при котором менее 1% ядер непосредственно получают треки, более 30% клеток имеют повышенную частоту сестринских хроматидных обменов. Вскоре эффект «свидетеля» был подтвержден еще рядом исследователей.

Открытие эффекта «свидетеля» показало, что эффект воздействия малых доз может быть более выраженным на единицу дозы и более опасным, чем считалось ранее, так как количество клеток, проявляющих негативные эффекты, существенно превышает количество непосредственно подверженных воздействию ИИ клеток.

Несмотря на то что величина эффекта «свидетеля» меньше, чем при прямом поражении, она вносит заметный вклад в риски, связанные с влиянием малых доз. К сожалению, необходимо констатировать, что далеко не все разделяют эту точку зрения – в публикации 103 МКРЗ, определяющей механизмы оценки воздействия радиации на организм человека, прямо указано, что он не принимается к рассмотрению в связи с недостаточной его изученностью. Однако очевидно, что его эффект имеет большое значение при оценке риска опухолеобразования (реализуемого через механизм генетической нестабильности) при облучении малыми дозами α-частиц, излучаемых радоном и продуктами его распада.

Вместе с тем эффект «свидетеля» может индуцироваться в опухолевых клетках, расположенных по соседству с облученными при радиотерапии рака, и, таким образом, эффект радиотерапии может сказаться генетическими эффектами и в необлученной части. В пользу этого свидетельствуют и данные о том, что в случае наличия основной опухоли и малых вторичных опухолей, образованных метастазами, при облучении основной опухоли параллельно уменьшается масса не только ее, но и вторичных (необлученных) опухолей. Кроме того, в облученной ткани по механизму эффекта «свидетеля» может развиваться и воспалительная реакция.

Эффект «свидетеля» может быть индуцирован различными видами излучений: рентгеновским и γ-излучением (с низкой ЛЭП), α-частицами и тяжелыми ионами (с высокой ЛЭП). Аналогичный эффект установлен для ультрафиолетового излучения и теплового воздействия. При радиационном воздействии эффект «свидетеля» выявляется начиная с дозы в 5 мГр. При такой дозе уровень повреждений ДНК мишенной клетки соответствует лишь пяти одноцепочечным разрывам, 10–15 поврежденным основаниям и лишь одному двуцепочечному разрыву в каждой пятой клетке.

Эффект стабильно проявляется в интервале доз 1–50 сГр. Он вызывается даже в том случае, если облучена только одна клетка всего одной α-частицей. Очевидно, что эффект «свидетеля» играет значительную роль только при малых дозовых нагрузках, когда число клеток-мишеней невелико. Его индукция при высоких дозах выходит на плато – непосредственно облученными становятся все клетки. По-видимому, природа эффекта заключается в коммуникации между облученной (мишенной)

клеткой и окружающими необлученными (немишенными) клетками через прямые физические контакты (например, щелевые контакты между клетками), культуральную среду или тканевую жидкость.

Как правило, такой немишенный эффект является неблагоприятным для клетки. Он приводит к разнообразным последствиям:

• снижает выживаемость клонов необлученных клеток;

• индуцирует задержку клеточного цикла, отсроченную гибель клеток, их апоптоз и неопластическую трансформацию;

• приводит к хромосомной нестабильности, способствует мутагенезу, вызывает сестринские хроматидные обмены и модифицирует экспрессию генов.

В целом это практически полная картина упоминавшейся ранее нестабильности генома. Одним из механизмов ее возникновения является хроническое увеличение уровня образования свободных радикалов.

Однако в некоторых случаях эффект «свидетеля» способствует пролиферации клеток или их терминальной дифференцировке, т.е. приводит к «полезным» эффектам. В этой связи стоит отметить, что от облученных клеток к необлученным может передаваться и наследственная радиорезистентность, что показано, например, в работе И.Е. Воробцовой и И.С. Колесниковой. Таким образом, механизмы адаптивного ответа и эффекта «свидетеля» могут пересекаться.

Более того, уже установлено, что эффекты, возникающие в клетках-«свидетелях», могут передаваться их потомкам, т.е. являются наследственными, что также характерно для явления геномной нестабильности. Таким образом, становится совершенно очевидно, что существует тесная связь между нестабильностью генома и эффектом «свидетеля», а состояние геномной нестабильности может быть непосредственным результатом эффекта «свидетеля». Следовательно, эффект «свидетеля» может быть одновременно и причиной, и следствием индуцированной нестабильности, поскольку он может вызываться воспалением, возникающим в результате облучения. В клетках, где имеет место эффект «свидетеля», гиперчувствительность к малым дозам не выявляется. Это связано с тем, что гиперчувствительные клетки при облучении погибают, а генетически не стабильными становятся более устойчивые клетки. Таким образом, при малых дозах эффект «свидетеля» может доминировать над другими формами ответа клетки на облучение.

По-видимому, эффект «свидетеля» является эволюционно-консервативным. Он отмечен у одноклеточных и примитивных многоклеточных организмов. Например, его удалось обнаружить у делящихся дрожжей Schizosaccharomyces pymbe. Эффект «свидетеля» обнаруживается у губок после воздействия УФ-облучения и перекиси водорода. Он характерен также для ракообразных, а среди позвоночных, помимо млекопитающих, отмечен у рыб. Например, облученная живая форель выделяет в воду вещества, вызывающие эффект «свидетеля» у рыб, помещаемых в эту воду.

Плазма крови людей, облученных при радиотерапии или вследствие несчастных случаев, вызывает так называемый кластогенный эффект у необлученных клеток. Так называемые кластогенные факторы обнаруживали даже в крови, отобранной спустя более 30 лет после облучения. Таким образом, плазма облученных животных и людей содержит вещества, способные индуцировать кластеризованное повреждение в необлученных клетках. Кластогенные факторы плазмы впервые описаны В. Парсонсом и коллегами в 1954 г., наблюдавшими повреждение красного костного мозга в грудине детей с хронической гранулоцитарной лейкемией, у которых была облучена селезенка.

Нормальные лимфоциты периферической крови человека, культивируемые в среде, содержащей плазму облученных людей, также несли значительно больше хромосомных аберраций, чем лимфоциты, культивируемые в среде с плазмой необлученных. Следовательно, внеклеточные радиационно-индуцированные повреждающие ДНК-факторы могут существовать длительный период времени после облучения. По-видимому, появление данных факторов не является результатом радиационно-индуцированного истощения защитных механизмов или изменения соотношения нормальных компонентов плазмы. Скорее всего, это молекулы или компоненты клеток, выделяемые в кровь в результате воздействия ИИ. Необходимо отметить, что кластогенный эффект, как и другие эффекты малых доз, выявляется не во всех экспериментах.

Точная молекулярная природа кластогенных факторов неизвестна до сих пор. В качестве вероятных кандидатов предлагаются воспалительные цитокины и свободные радикалы. Перехватчики свободных радикалов снижают или сводят к нулю активность кластогенных факторов. Нельзя исключить и возможность того, что кластогенные факторы не появляются в результате облучения, а представляют собой эндогенные вирусы. Возможно, что кластогенные факторы и сигналы, вызывающие эффект «свидетеля», одни и те же. По крайней мере, и те, и другие индуцируются ИИ и вызывают генетические повреждения в необлученных клетках. Стоит отметить, что кластогенные факторы могут возникать не только при облучении. Они обнаруживаются в плазме крови при вдыхании асбеста, инфаркте, гепатите С, болезни Крона, склеродерме, у больных с синдромами хромосомной нестабильности и др.

Эффект «свидетеля» не вписывается в существующую радиобиологическую парадигму, согласно которой клетка, а вернее ее ДНК, признается основной мишенью действия ИИ, поскольку он представляет

собой многоклеточный тип радиационного ответа в трехмерном пространстве ткани. Известно, что функция клетки в окружающей ее ткани регулируется водорастворимыми малыми молекулами и сигнальными пептидами, а также внеклеточным матриксом. Вероятно, при облучении происходит устойчивое нарушение сигнальных механизмов, что и приводит к повреждению соседствующих необлученных клеток. Таким же образом могут возникать адаптивный ответ и радиационно-индуцированная нестабильность генома.

Существует несколько моделей, объясняющих природу межклеточных сигналов, ответственных за эффект «свидетеля»:

- через щелевые контакты;
- напрямую через плазматические мембраны;
- посредством взаимодействия между рецепторами и их ауто- или паракринными лигандами.

При соприкосновении облученной и необлученной клеток важную роль в передаче сигнала играют щелевые контакты, присутствующие практически во всех клетках организма. Возможными кандидатами являются долгоживущие органические радикалы. Известно, что подобные молекулы способны существовать около суток и вызывать мутации и трансформацию клеток.

Эффект «свидетеля» более выражен в клеточных популяциях, имеющих дефекты репарации двухцепочечных разрывов. В более поздних исследованиях было установлено, что выделение сигнала облученной клеткой при эффекте «свидетеля» не зависит от наличия в ней нерепарированных повреждений ДНК и репаративной способности клетки. Сигнал одинаково эффективен вне зависимости от того, произведен он клеткой дикого типа или клеткой с мутациями генов репарации одно- или двухцепочечных разрывов. Спектр мутаций при эффекте «свидетеля» сходен со спонтанным, но отличается от наблюдаемого при непосредственном облучении ядер. Мутации в клетках-«свидетелях», как правило, являются точковыми, тогда как в облученных клетках преобладают делеции.

По механизму эффекта «свидетеля» протекает так называемый эффект гибели, когда генетически не стабильные клоны клеток могут быть цитотоксичными по отношению к родительскому клону. Перенос профильтрованной среды от нестабильных потомков облученных клеток к необлученным в ряде экспериментов приводит к тотальной индукции гибели последних.

Известен также митогенный эффект «свидетеля»: облучение малыми дозами α-частиц стимулирует пролиферацию необлученных клеток, обработанных супернатантом, полученным от облученных. Интенсивно изучаются молекулярно-биохимические изменения, происходящие в самой клетке-«свидетеле». Важную роль в ответе клетки-«свидетеля» могут играть ATM и ATR-зависимые пути.

Итак, эффект «свидетеля» относится к группе так называемых немишенных эффектов малых доз радиации, когда необлученные клетки, получающие от облученных клеток сигнал цитокинной или свободнорадикальной природы, изменяют свою физиологию таким образом, что в одних случаях через генерацию АФК происходит повреждение ДНК клетки-«свидетеля», в других – стимуляция ее дифференцировки, пролиферации, адаптивного ответа или гибели (рис. 8.2). В результате эффект «свидетеля» непосредственно связан с такими эффектами малых доз, как апоптоз, генетическая нестабильность и адаптивный ответ.

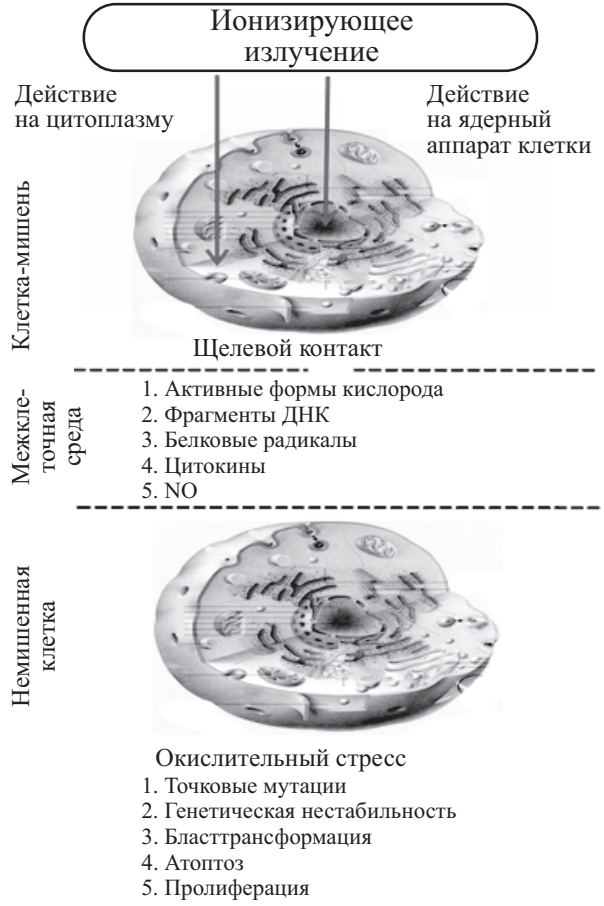

Рис. 8.2. Иерархия событий, обусловливающих эффект «свидетеля»

Контрольные вопросы

1. Как традиционно объясняются биологические эффекты в облученных клетках?
2. Результаты каких экспериментов привели к современному всплеску научного интереса к эффекту «свидетеля»?
3. Какими видами излучений может быть индуцирован эффект «свидетеля»? В диапазоне каких доз этот эффект наблюдается?
4. Какие неблагоприятные последствия для клетки вызывает немишенный эффект?
5. У каких организмов обнаружен эффект «свидетеля»?
6. Каким образом выявлен кластогенный эффект?
7. Как можно охарактеризовать существующие модели, объясняющие природу межклеточных сигналов, ответственных за эффект «свидетеля»?
8. Какую схему, отражающую иерархию событий, обусловливающих эффект «свидетеля», можно начертить?

8.3. Адаптивный ответ

Практически все организмы (от бактерий до млекопитающих) обладают способностью к быстрой адаптации, что обеспечивает их выживание в непрерывно меняющихся условиях окружающей среды. Повышенная устойчивость клетки или организма к повреждающему действию фактора после предварительного воздействия такого фактора в малой дозе получила название «адаптивный ответ». Это широко распространенное явление, которое наблюдается у всех изученных организмов. Таким образом, основное биологическое значение адаптивного ответа состоит в защите клетки и организма от высоких доз опасных агентов.

В 1960 г. Дж. Майсин с соавторами получил данные об увеличении устойчивости крыс к действию летальной дозы рентгеновских лучей после предварительного облучения в дозе 5 сГр. Хотя повышение выживаемости не было статистически достоверным, это исследование впервые показало наличие модифицирующего эффекта малых доз на радиочувствительность. Экспериментальное доказательство существования радиоадаптивного ответа впервые получено Г. Оливьери с соавторами при изучении мутагенного действия рентгеновского излучения на лимфоциты человека. Было обнаружено, что при выращивании лимфоцитов человека на среде с добавлением низких концентраций меченного тимидина, являющегося источником хронического облучения в дозе 30–40 сГр, происходит значительное снижение уровня индукции хромосомных перестроек острым облучением в дозе 150 сГр.

Позже было показано, что радиоадаптивный ответ приводит к уменьшению уровня различных цитогенетических нарушений, мутаций, предотвращает гибель клеток и неопластическую трансформацию, повышает активность антиоксидантных ферментов и систем репарации ДНК. Таким образом, радиационно-индуцированный адаптивный ответ проявляется в снижении чувствительности к повреждающей дозе радиации (приобретении радиационной резистентности) после предварительного облучения в малой (адаптирующей) дозе.

Недавно также было установлено, что малые дозы радиации (100 мГр) приводят к качественному изменению паттернов генетической экспрессии клеток, отличному от паттернов экспрессии, индуцируемых облучением в больших дозах. Транскрипционный фактор p53 имеет ключевое значение в определении клеточного ответа на облучение. Главными мишенями p53 являются гены контроля клеточного цикла и апоптоза. В диапазоне больших доз p53 обеспечивает остановку клеточного цикла и репарацию или гибель клетки в случае наличия нерепарируемых повреждений ДНК.

При изучении механизмов адаптивного ответа неоценимую роль оказывают полногеномные исследования радиационно-индуцированных генов с помощью технологии экспрессионных микрочипов. Было показано, что в ответ на облучение в дозе 3 Гр индуцируется активность 87 генов, тогда как репрессируется 227 генов. При дозе 10 Гр репрессируется 156 генов и индуцируется 660 генов. Большинство из них вовлечено в контроль клеточного цикла, гибель клетки, репарацию и метаболизм ДНК.

Таким образом, в исследованиях *in vitro* показано, что в радиоадаптивный ответ вовлечены механизмы репарации ДНК в контрольных точках клеточного цикла, ответа на повреждение ДНК.

Общее облучение организма животных может вести к повышению радиоустойчивости как соматических, так и половых клеток. Адаптивный ответ можно наблюдать на примере развития радиоустойчивости целого многоклеточного организма. Роль белков теплового шока в адаптивном ответе вызывает особый интерес, поскольку подразумевает общность молекулярно-клеточных систем стресс-ответа для разных видов стресса и существование перекрестной адаптации к различным экологическим факторам (температуре, ИИ, окислительному стрессу). В то же время остается неясным вопрос о роли белков теплового шока в формировании устойчивости к воздействию ИИ в малых дозах и на уровне целого организма (рис. 8.3).

В итоге адаптивный ответ является одним из самых специфических эффектов облучения в малых дозах.

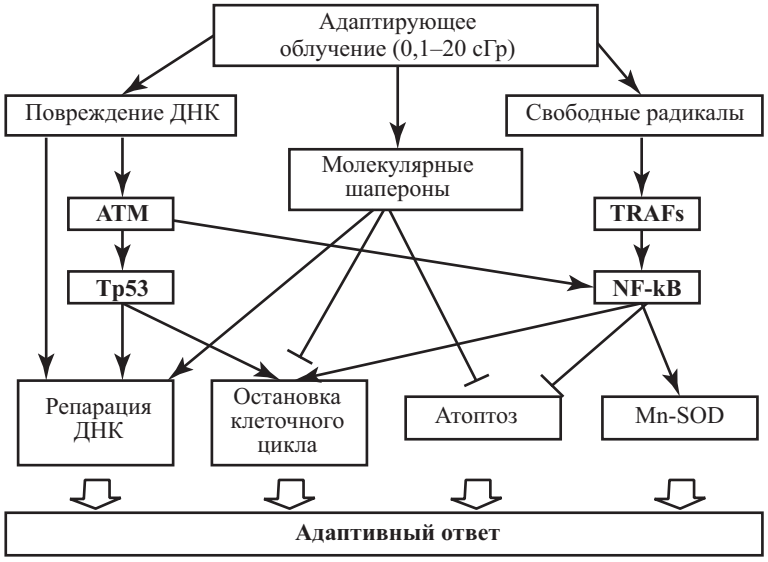

Рис. 8.3. Механизмы, принимающие участие в индукции адаптивного ответа

Оптимальная индукция радиоадаптации происходит в диапазоне доз 0,1–20 сГр. Запуск внутриклеточных сигнальных путей в результате окислительного стресса и повреждения ДНК приводит к активации основных транскрипционных факторов. Опосредованный ими эффект активации молекулярных шаперонов, антиоксидантной защиты, процессов репарации и ингибирования апоптоза подготавливает клетку к воздействию неблагоприятных факторов и делает ее более устойчивой к облучению в больших дозах.

Обобщая соматические эффекты воздействия ИИ в малых дозах, следует отметить, что клетки реагируют на радиационно-индуцированное повреждение индукцией большого количества биологических ответов. Эти ранние события определяют дальнейшую судьбу облученных клеток: будет ли клетка подвергаться митотической гибели, некрозу, апоптозу, старению или в конечном счете выживанию и вступит в новый митотический цикл. Если клетка выживет, первичный биологический ответ на радиационно-индуцированное повреждение может влиять на то, будет ли клетка нормально делиться или дифференцироваться, иметь ограниченную продолжительность жизни либо приобретет характеристики геномной нестабильности и станет бласттрансформированной.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит основное биологическое значение адаптивного ответа?
2. Какое исследование впервые показало наличие модифицирующего эффекта малых доз на радиочувствительность?
3. В результате какого исследования было впервые экспериментально доказано существование радиоадаптивного ответа? В чем этот ответ проявляется?
4. К каким последствиям для жизнедеятельности клетки приводят их облучения малыми дозами?
5. Какую роль оказывают полногеномные исследования радиационно-индуцированных генов? Какой пример можно привести?
6. Почему роль белков теплового шока в адаптивном ответе вызывает особый интерес?
7. Какую схему, иллюстрирующую механизмы, которые принимают участие в индукции адаптивного ответа, можно начертить?
8. В диапазоне каких доз происходит оптимальная индукция радиоадаптации? Каким образом осуществляется этот процесс?

8.4. Радиационный гормезис

К малым дозам ИИ принято относить такие, при которых через ядро клетки проходит одна ионизирующая частица и вызывает один акт ионизации на весь трек. В зависимости от размеров ядра клетки это дозы порядка 100 мГр. Результаты биологических исследований в области малых доз ИИ достаточно противоречивы и статистически не всегда доказательны. Поэтому одной из основных проблем в радиобиологии является зависимость доза – эффект для радиационно-индуцированных поражений.

В настоящее время существует две противостоящие друг другу модели для оценки риска стохастических эффектов ионизирующей радиации в зависимости от дозы облучения.

В основе первой модели лежит экстраполяция результатов, полученных при исследовании эффектов больших дозах, в область малых доз. Из этого следует, что риск возникновения рака при облучении малыми дозами ИИ наилучшим образом оценивается линейными отношениями без порога и любая сколь угодно малая доза повышает вероятность возникновения рака и других заболеваний.

Вторая модель постулирует, что существует пороговая доза, ниже которой радиация не может вызвать заболеваний канцерогенной и (или) неканцерогенной природы. Эта модель опирается прежде всего на концепцию радиационного гормезиса.

Понятие радиационного гормезиса предполагает, что ИИ, являясь при больших дозах губительным для живых организмов, в малых дозах может индуцировать положительные биологические процессы и

оказывать стимулирующее благоприятное действие на организм, которое регистрируется как повышение плодовитости, роста, деления клеток и увеличение продолжительности жизни различных биологических объектов.

Стимулирующий эффект ИИ наблюдается и при больших дозах, когда облучению подвергаются радиорезистентные организмы, но в этом случае механизмы радиостимуляции, по-видимому, иные, чем при действии малых доз.

Проблема радиационного гормезиса актуальна и как проблема, затрагивающая охрану здоровья множества людей. Если действие малых доз благоприятно для организма, то, может быть, целесообразно пересмотреть нормы радиационной безопасности в сторону повышения границ предельно допустимых лучевых нагрузок как на персонал, связанный с работой с источниками ионизирующего излучения, так и на население. Обеспечение мероприятий по радиационной защите требует значительных денежных средств, и смягчение норм радиационной безопасности может привнести огромную экономическую выгоду.

К настоящему времени во всем мире проведено большое число эпидемиологических исследований популяций человека, облученных в результате ядерных бомбардировок или аварий, связанных с выбросом радионуклидов; популяций, проживающих на территориях с повышенным естественным радиационном фоном; контингентов, профессионально контактирующих с ионизирующим излучением. Во всех этих исследованиях регистрировался эффект радиационного гормезиса.

Согласно докладу Научного комитета (ООН) по действию атомной радации (НКДАР) среди выживших после атомной бомбардировки Хиросимы и получивших дозы около 10 бэр наблюдалось достоверное снижение общего коэффициента смертности, и в частности коэффициента смертности от лейкемии, по сравнению с необлученной частью населения соответствующего возраста. Коэффициент смертности мужчин, получивших при атомной бомбардировке Нагасаки дозы менее 150 сГр, был достоверно ниже коэффициента смертности мужчин из необлученной когорты.

Результаты эпидемиологического обследования почти 108 000 рабочих судостроительной промышленности США продемонстрировали статистически достоверное снижение общей смертности и смертности от всех злокачественных новообразований у облученных рабочих по сравнению с необлученными.

Снижение смертности от онкозаболеваний зарегистрировано среди военных наблюдателей из США и Англии за ядерными взрывами в атмосфере. Смертность канадских военных наблюдателей составила 88% от контроля, при этом смертность от лейкозов – 40% от контроля.

Коэффициент смертности от лейкемии был достоверно снижен в когорте работников атомной промышленности Англии и США по сравнению с необлученным персоналом. Смертность от раков и лейкозов среди рабочих атомной промышленности Канады также была ниже на 58% общенационального уровня смертности от этих причин.

В 1957 г. в результате аварийного выброса радиоактивных веществ на Южном Урале три группы жителей 22 поселков общим числом 7852 человека получили в среднем дозы по 50, 12 и 4 сГр. Наблюдения в течение последующих 30 лет показали достоверное снижение смертности от разных видов опухолей во всех трех группах. Смертность составила соответственно 28, 39 и 27% по сравнению с необлученной популяцией. Сравнение групп населения, подвергшихся в результате этой аварии хронической ингаляции ^{239}Pu и получивших 0,343, 1,18 и 4,2 кБк, показало, что риск заболевания раком легкого был достоверно снижен по сравнению с необлученным контролем на 46, 41 и 47% соответсвенно.

В исследовании, охватившем 90% населения США, была продемонстрирована строгая тенденция снижения частоты заболевания раком легких с увеличением уровня концентрации природного радиоактивного газа радона в домах жителей.

Вытекающий из результатов эпидемиологических исследований вывод об антиканцерогенном действии малых доз радиации подтверждается многочисленными лабораторными экспериментами. Так, облучение при дозе 15 сГр подавляло рост опухолей после введения раковых клеток мышам; облучение при той же дозе уменьшало число метастазов в легких мышей и крыс; облучение при дозе 1 сГр снижало частоту неопластической трансформации клеток; хроническое облучение мышей в течение 5 суток при ежедневной дозе 1 сГр подавляло возникновение у них лимфомы щитовидной железы.

Стимуляция клеточного деления как эффект действия малых доз ИИ наблюдается у ряда других биологических объектов: культуры клеток млекопитающих, синезеленых водорослей, инфузорий.

Экранирование от естественного радиационного фона приводит к снижению клеточной пролиферации. Впервые это явление, выразившееся в снижении пролиферативной активности у простейших и задержке вылупления личинок дрозофилы, обнаружил Г. Планель. Уменьшение редкоионизирующего компонента естественного радиационного фона Земли в 20 раз приводило к увеличению скорости старения и отмирания штаммов дрожжевых клеток.

Существует несколько моделей, пытающихся объяснить эффект радиационного гормезиса. Опубликованная в 2003 г. модель М. Полякова и Л.Е. Фининдегана является самой поздней из них. Согласно ей действие малых доз ИИ на клетку в отличие от больших доз двойственно по

своей природе. С одной стороны, происходит повреждение ДНК с немедленным запуском репаративных систем, с другой – посылается сигнал о стимуляции физиологических процессов, нейтрализующих повреждения ДНК. Эти адаптивные физиологические процессы запускаются не сразу, они неспецифичны и направлены главным образом на нейтрализацию нерадиационных повреждений ДНК. Выделяются следующие адаптивные клеточные процессы:

- стимуляция радикальной системы детоксикации;
- защита от хромосомных аберраций, происходящая путем активации нескольких систем репарации ДНК;
- удаление повреждения путем индуцирования иммуннокомпетентности, связанное с возрастанием числа лимфоцитов;
- апоптоз латентно поврежденных клеток.

Повреждения ДНК нерадиационной природы превалируют над радиационными повреждениями и по этой причине ответственны в первую очередь за регистрируемый фон канцерогенеза и старение организма. При дозах свыше 20 сГр уровень возникающих клеточных радиационных повреждений уже будет превышать возможности снижения их защитными механизмами клетки и кривые доза–эффект будут соответствовать обычной линейной или квадратично-линейной модели.

Доказательства антиканцерогенного действия малых доз ИИ достаточно убедительны, но остаются сомнения в отношении их влияния на заболевания неканцерогенной природы, и особенно здоровья детей.

Результаты многочисленных работ свидетельствуют о радиационных повреждениях у детей, родившихся от женщин, облученных в диагностических дозах до оплодотворения или после. Возрастание канцерогенного риска прямо пропорционально числу диагностических рентгеновских облучений или полученной фетальной дозе: так, по расчетам, облучение плода незадолго до рождения при дозе 1сГр приводит дополнительно к 300–800 смертям от рака на 1 млн в возрасте до 10 лет.

У облученных при малых дозах ранними радиогенными биохимическими симптомами является подъем уровня катаболитов липоперекисного каскада с одновременным и сопряженным истощением системы незаменимых антиоксидантов, объединенных в понятие «чернобыльский синдром». Число случаев увеличения щитовидной железы и расстройств зрения (в основном синдром сухих глаз) зависело от уровня радиоактивного загрязнения. У детей, проживающих в Чернобыльской зоне, наблюдался повышенный уровень продуктов перекисного окисления.

Основываясь на результатах своих исследований и обобщая другие экспериментальные данные, Е.Б. Бурлакова с соавторами пришла к выводу, что при малых и сверхмалых интенсивностях ИИ обладает уникальной способностью в десятки раз увеличивать биологический эффект. При этом:

- зависимость эффекта от дозы облучения носит немонотонный, полимодальный характер;
- дозы, при которых наблюдаются экстремумы, зависят от мощности (интенсивности) облучения;
- облучение в малых дозах приводит к изменению (в большинстве случаев увеличению) чувствительности к действию повреждающих факторов;
- в определенных интервалах доз низкоинтенсивное облучение более эффективно, чем острое.

Например, в зависимости от интенсивности облучения у ряда объектов в области малых доз можно наблюдать либо антимутагенный эффект, либо, наоборот, повышение числа мутаций или цитогенетических нарушений на единицу дозы; стимуляцию роста клеточной популяции либо, наоборот, повышенную радиочувствительность клеток по сравнению с ожидаемой линейной зависимостью. Это объясняют тем, что при низких дозах, сравнимых с уровнем естественной радиации, степень повреждения ДНК слишком мала, чтобы активизировать адекватный уровень репарации генетических повреждений.

Определяя радиационный гормезис как «благоприятное действие радиации», ученые тем самым apriori считают увеличение плодовитости или биомассы животных и растений (часто наблюдаемые эффекты радиационного гормезиса) благоприятным и полезным. На самом же деле увеличение плодовитости или биомассы не означает пользу для организма. Для организма это в любом случае отход от физиологической нормы. Отличия от нормы могут быть гипо- или гиперфункциональными и на выживаемость организма и в том, и в другом случае могут влиять как положительно, так и отрицательно.

Увеличение выживаемости, плодовитости, продолжительности жизни особей может приводить к увеличению груза мутаций (даже если принять, что радиационное воздействие само по себе не вносит дополнительных мутаций), изменению возрастных и половых пропорций в популяции. Повышение радиоактивного фона до уровня, вызывающего увеличение размножения и выживаемости вследствие различной видовой радиочувствительности к стимулирующему действию ИИ, также может привнести изменения в сообщество организмов ввиду повышения конкурентных способностей «простимулированного» вида. ИИ может активизировать и размножение болезнетворных микроорганизмов со всеми вытекающими из этого последствиями.

С физиологических позиций любое воздействие на биологический объект может вызывать как гипофункциональный, так и гиперфункциональный ответ соответствующих систем организма. Тогда под радиационным гормезисом нужно понимать класс событий, в которых наблюдается превышение при действии ИИ каких-либо жизненных функций, процессов или физиологических параметров над биологической или физиологической нормой, т.е. как гиперфункциональный эффект ИИ при малых дозах, а не как благоприятный эффект радиации.

Можно уверенно говорить об антиканцерогенном действии фоновых доз ионизирующей радиации и лечебном эффекте малых доз, в частности в радонотерапии. Но может ли с этих позиций эффект радиационного гормезиса служить аргументом в споре о возможном смягчении норм радиационной безопасности? Однозначно, нет, так как дозовые зависимости в области малых доз носят сложный и далеко не прогнозируемый характер. И радиационный гормезис является лишь одним из эффектов, наблюдаемых в этой области.

Контрольные вопросы

1. Какие дозы ионизирующих излучений принято называть малыми дозами?
2. В чем заключается суть двух противостоящих друг другу моделей для оценки риска стохастических эффектов ионизирующей радиации в зависимости от дозы облучения?
3. Что предполагает понятие «радиационный гормезис»?
4. Почему проблема радиационного гормезиса актуальна для современной радиобиологии?
5. К каким результатам привели эпидемиологические исследования последствий воздействия техногенного ионизирующего излучения в малых дозах на человеческие популяции? Какие конкретные примеры можно привести?
6. Что показали многочисленные лабораторные эксперименты по изучению малых доз радиации?
7. К чему приводит экранирование живых организмов от естественного радиационного фона?
8. Как объясняет эффект радиационного гормезиса модель М. Полякова и Л.Е. Фининдегана?
9. Что означает понятие «чернобыльский синдром»?
10. К каким выводам пришла Е.Б. Бурлакова с соавторами, основываясь на результатах своих исследований и обобщая другие экспериментальные данные о воздействии малых и сверхмалых интенсивностях ИИ ?
11. Означает ли однозначную пользу для организма увеличение его плодовитости или биомассы в результате радиационного гормезиса?
12. Может ли эффект радиационного гормезиса служить аргументом в споре о возможном смягчении норм радиационной безопасности?

Глава 9

РАДИАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ И РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ НАСЛЕДСТВЕННЫЙ УЩЕРБ

9.1. Трансгенерационные изменения при облучении

Облучение половых клеток родителей приводит к возникновению различных мутаций у потомства, что может проявляться преимущественно:

- в повышенной частоте врожденных уродств;
- мертворождениях;
- постнатальной гибели;
- функциональной неполноценности, сопровождающейся пониженной жизнеспособностью;
- повышенном риске канцерогенеза;
- нестабильности генома.

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные убедительно свидетельствуют о том, что ионизирующее излучение может оказывать выраженное влияние на стабильность генома, передающееся через половые клетки облученных родителей к их потомкам. При этом опубликованные на сегодня данные указывают на то, что эффекты в потомстве проявляются даже тогда, когда облучению подвергнут лишь один из родителей (например, отец). Это явление получило название «трансгенерационная нестабильность» и приводит к нарастанию темпов мутагенеза в зародышевой линии клеток, что в итоге ведет к увеличению риска возникновения онкологических заболеваний.

По разным источникам, спектр трансгенерационных изменений в соматических тканях потомков весьма широк – от высокого риска развития злокачественных опухолей до изменения поведенческих реакций.

Особый толчок исследование у потомков облученных родителей получило после появления данных об увеличении частоты лейкемий у детей, появившихся на свет в населенных пунктах вблизи завода по переработке ядерного топлива в семьях сотрудников предприятия (США).

Также удалось установить, что при повторных исследованиях частота раковых опухолей уже не превышала контрольный уровень, однако качественный состав опухолей у детей в результате облучения родителей изменился.

Кроме того, было установлено, что происходит увеличение частоты злокачественных опухолей у потомков облученных родителей, если они в последующем подвергались дополнительному воздействию канцерогенов различной природы, по сравнению с потомками необлученных. При этом спектр опухолей существенно отличался от спонтанного. В результате такого рода исследований был сделан вывод о том, что облучение отцов может способствовать возникновению рака у потомства.

Если геномная нестабильность приводит к возрастанию риска онкопатологии у потомков облученных родителей, то следовало допустить, что у них будет иметь место и увеличение уровня соматических мутаций в целом. Так, в 2003 г. российскими учеными в экспериментах на потомках облученных самцов мышей было показано увеличение частоты хромосомных аберраций, микроядер и других изменений генетического материала. Также было обнаружено статистически достоверное повышение частоты микроядер в клетках костного мозга у потомков первого поколения самок и самцов мышей, облученных в дозах 0,1–0,5 Гр, по сравнению с потомством необлученных животных.

В 80-е гг. XX в. Льюингом было выдвинуто предположение о том, что при облучении самцов происходит возрастание уровня не только соматических мутаций (т.е. во всех клетках организма, кроме половых – ответственных за размножение), но аналогичные эффекты (аберрации, хромосомные мутации) должны наблюдаться и в герминативных клетках потомков. Свою гипотезу он доказал в экспериментах, подтвердивших увеличение частоты эмбриональной гибели, снижение пролиферации клеток на ранних стадиях эмбрионального развития и рост числа наследственных уродств у потомков второго поколения.

Воздействие ионизирующей радиации приводит также и к увеличению мутационного груза у человека. Первые исследования потомства облученных людей относятся к 30-м гг. XX в. Эти работы были выполнены в США и Германии. Проводилось обследование потомства женщин, которые испытали воздействие ионизирующего излучения в области таза в радиотерапевтических целях. Также было обнаружено некоторое повышение количества дефектов развития. Затем появились данные, касающиеся изменений состояния здоровья в потомстве у мужчин-радиологов. Среди потомства этих мужчин было выявлено значительное учащение случаев врожденных уродств, выкидышей и мертворождений. Высокий риск лейкемий и врожденных дефектов доказан для детей, отцы которых подвергались хроническому воздействию радионуклидов на заводах по переработке ядерного топлива и при диагностическом облучении, а не острому воздействию ИИ, как это было в Хиросиме и Нагасаки.

Тем не менее взрыв атомной бомбы в Хиросиме и Нагасаки, как оказалось, не привел к существенным генетическим дефектам в потомстве. Однако эти данные не являются абсолютными, так как, например, в результате Чернобыльской катастрофы население подверглось хроническому низкодозовому воздействию ИИ. Хорошо известно, что максимальные дозы острого, пролонгированного и хронического облучения получили ликвидаторы аварии 1986–1987 гг. Так, дети, рожденные в семьях ликвидаторов, имели значительное увеличение изменений ДНК, если были зачаты после участия в ликвидационных работах, по сравнению с группой сравнения, в качестве которой выступали их братья и сестры, рожденные до аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС).

Такого рода исследования были проведены в России и в Украине. В целом полученные данные однозначно подтверждали, что у детей ликвидаторов меняется цитогенетический статус и может увеличиваться индивидуальная радиочувствительность. К сожалению, имеющихся у ученых данных на сегодняшний день недостаточно, чтобы сделать какие-либо окончательные выводы. Это связано зачастую с отсутствием достоверной дозиметрической информации, различиями в методических подходах, объемах выборок и т.д.

В то же время эти данные позволяют предположить, что возникающие после облучения половых клеток дву- и одноцепочечные разрывы в случае их нерепарирования (или неверного репарирования) могут быть крайне опасными, приводя в итоге к формированию синдрома геномной нестабильности и, как следствие, к росту предрасположенности к раку потомков облученных индивидуумов.

Еще одной причиной могут быть радиационно-индуцированные генные мутации в генах, ответственных за поддержание стабильности генома. Тем не менее есть данные, говорящие и о возможной эпигенетической природе трансгенерационной нестабильности генома:

- она поддерживается длительный период времени после первоначального воздействия и не вызывает реакции со стороны иммунной системы;
- ее уровень зачастую слишком высок, чтобы его можно было объяснить прямыми мутациями генов репарации ДНК.

Наиболее вероятными механизмами эпигеномной изменчивости в этом случае являются метилирование ДНК и атипичные изменения конденсации хроматина в половых клетках облученных родителей. Как известно, метилирование ДНК имеет место при сперматогенезе и может проявляться на ранних стадиях эмбриогенеза, а также передаваться

через многие поколения. Метилирование существенно влияет на паттерн экспрессии генов, в том числе и тех, которые отвечают за целостность генома.

Также вероятен вклад в этот процесс изменений, возникающих в ответ на радиационно-индуцированный окислительный стресс и воспалительный процесс, т.е. вторичных эффектов, возникающих по свободно-радикальному механизму.

Например, постоянно высокий уровень свободных радикалов обнаружен у потомков облученных соматических клеток в культуре. Он вполне может стать пусковым событием для каскада молекулярных событий, приводящих в конечном счете к нестабильности генома. Однако надо иметь в виду, что количество цитоплазмы в зрелом спермии слишком мало для переноса в зиготу достаточного количества долгоживущих радикалов. Известно, что свободные радикалы, возникающие в процессе воспаления, могут влиять на ДНК, вызывая разнообразные повреждения. Таким образом, речь идет, вероятнее всего, о каком-то ДНК-зависимом сигнале, наследуемом от облученного отца.

К тому же зачастую наблюдается необычно высокий уровень мутационного мозаицизма как в половых клетках, так и в соматических тканях мышей в первом поколении, что предполагает значительное усиление скорости мутирования, приуроченное к очень ранней стадии развития. В этом смысле особый интерес представляет изучение вопросов, связанных с мутированием не только ядерной, но и внеядерной ДНК, сосредоточенной в митохондрионе. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что ранее признаваемый факт передачи внеядерной наследственной информации по материнской линии в настоящее время отвергнут — в оплодотворенную яйцеклетку могут проникать и митохондрии сперматозоида.

Действительно, в ряде работ уже показано устойчивое изменение паттерна экспрессии генов у потомков облученных самцов мышей. Возможно, трансгенерационная передача повышенного риска онкогенеза связана с кумулятивными изменениями, последовательно формирующимися по каскадному механизму в протоонкогенах, влияющих на иммунную систему, контроль клеточного цикла и репарационные функции клетки, что способствует ускорению образования опухолей. Эта гипотеза поддерживается исследованиями, выполненными с помощью GeneChip-анализа (молекулярные чипы).

В другой работе воздействие на родителей γ-облучения в дозе 1 Гр привело к существенному изменению экспрессии генов даже в третьем поколении мышей в сравнении с потомками необлученных родителей.

Еще одним путем возникновения трансгенерационной геномной нестабильности является репликативный стресс. В этом случае длительная задержка или остановка репликации отдельных хромосом может приводить к формированию синдрома хромосомной нестабильности. Есть данные, свидетельствующие о сохранении трансгенерационных изменений у потомков самцов, облученных в поздней постмейотической стадии сперматогенеза, когда большинство путей поддержания целостности генома неактивно. Кроме того, предмутационные повреждения ДНК сперматозоидов эффективно репарируются в течение нескольких часов после оплодотворения. Распознавание и репарация данных повреждений в оплодотворенной яйцеклетке сопровождаются подавлением синтеза ДНК в обоих пронуклеусах (облученном мужском и необлученном женском) и изменяют экспрессию генов репарации ДНК в предимплантационном эмбрионе. Таким образом, радиационно-индуцированное повреждение ДНК спермы может позже запускать каскад событий в оплодотворенной яйцеклетке, приводя к эпигенетической модификации, сохраняющейся в клетках зародыша.

Несмотря на то что темп мутагенеза в клетках потомков облученных родителей часто значительно повышен, роль генетического фона родителей в этом явлении исследована еще недостаточно. Выраженность трансгенерационной нестабильности генома, как оказалось, во многом зависит от генотипа исследуемой линии животных. Радиационно-индуцируемая трансгенерационная геномная нестабильность у потомков проявляется не всегда, что предполагает вклад в ее формирование материнского генотипа и статуса состояния системы репарации ДНК. Радиационно-индуцированные двуцепочечные разрывы в головке спермия репарируются в зиготе дикого типа в начале стадии клеточного цикла S по механизму негомологичного воссоединения концов. Межлинейные различия в эффективности ДНК репарации в ооците значительно влияют на выход доминантных летальных мутаций, индуцируемых в половых клетках самца. Кроме того, учитывая эволюционно сложившиеся особенности онтогенеза человека, нельзя, как уже отмечалось ранее, механически переносить данные, полученные на экспериментальных животных, непосредственно на человека.

Суммируя вышесказанное, можно сделать следующее заключение: облучение хотя бы одного из родителей может приводить к появлению признаков генетической нестабильности в соматических и половых клетках потомков, включая повышенные уровни мутагенеза и тератогенеза, а также нарастание риска возникновения онкопатологии (рис. 9.1).

Рис. 9.1. Схема вероятностных эффектов трансгенерационной нестабильности генома

Возможным передатчиком сигнала могут выступать нерепарированные разрывы ДНК, свободные радикалы, эпигенетические или мутационные изменения активности генов, отвечающих за поддержание стабильности генома (рис. 9.2).

Однако при облучении родителей в последующие поколения потомков может передаваться не только предрасположенность к генетической нестабильности, но и, напротив, относительная радиоустойчивость к дальнейшему неблагоприятному воздействию. В таком случае говорят о формировании феномена радиоадаптации.

Контрольные вопросы

1. Каким образом могут проявляться мутационные изменения половых клеток, вызванные ионизирующим облучением?
2. В чем суть явления, получившего название «трансгенерационная нестабильность»?
3. К каким результатам привели эксперименты российских ученых в 2003 г. и Льюинга в 80-е гг. XX в.?

Рис. 9.2. Возможные механизмы трансгенерационной нестабильности генома

4. Что показали исследования состояния здоровья в потомстве у мужчин-радиологов?
5. Какие механизмы эпигеномной изменчивости наиболее вероятны? Почему?
6. Какие схемы вероятностных эффектов трансгенерационной нестабильности генома и возможных механизмов трансгенерационной нестабильности генома можно начертить?

9.2. Феномен радиоадаптации и его роль в реакции организма на ИИ

Естественный радиационный фон на Земле составляет в среднем около 1 мГр/год и находится на постоянном уровне уже около 4 млрд лет, поэтому большинство организмов никогда не сталкивалось с высокими дозами облучения и в процессе эволюции не выработало приспособления к ним.

Несмотря на это, при повышении радиационного фона как следствия естественных причин, так и результата влияния антропогенных факторов многие организмы оказываются способными переживать более сильное радиационное воздействие.

Под адаптацией к ИИ понимают такое приспособление к радиационной нагрузке, которое делает возможным сохранение жизнеспособности, поддержание фертильности и нормальной функциональной стабильности всех структур биологического объекта в условиях дальнейшего воздействия ИИ. На практике провести полное исследование всех трех указанных компонентов не представляется возможным, поэтому для оценки радиационной адаптации используют радиорезистентность организма и клеток его критических органов.

Следует также учитывать, что в природных условиях популяции оказываются под одновременным влиянием большого числа факторов, способных модифицировать радиорезистентность организма. Естественный фон планеты, конечно, колеблется. Однако его плавные колебания вполне могут быть скомпенсированы в ряду поколений благодаря механизмам естественного отбора и адаптационному потенциалу.

Человек, как и любое млекопитающее, способен адаптироваться к новым условиям. Однако благодаря технологической революции влияние человека на окружающую среду резко усилилось. Так, вследствие испытания ядерного оружия в некоторых регионах планеты естественный фон вырос примерно в 20 раз. В этом случае адаптационная изменчивость «не поспевает» за быстро меняющейся окружающей средой.

Создается реальная ситуация, когда человеку как биологическому виду грозит срыв адаптаций и ее переход в звено патогенеза. При этом специфика эффекта определяется «слабым» звеном организма. В этом смысле возможно появление любой формы экозависимой патологии.

В то же время известно, что некоторые особи из популяций, обитающих на территориях с повышенным радиационным фоном (до нескольких десятков миллигрэев), становятся более устойчивыми к действию высоких доз облучения. Так, некоторые особи Drosophila nebulosa и D. willistoni, отловленные из популяций, обитающих в лесах с высоким естественным радиационным фоном (штат Минас Гериас, Бразилия), характеризуются устойчивостью к облучению в дозах до 900 Гр, хотя и несут больший генетический груз, чем особи контрольных популяций, обитающих на территориях с низким радиационным фоном.

Исследования, проводимые на диких популяциях микроорганизмов, растений и животных, обитающих в районе 30-километровой зоны ЧАЭС, позволили выявить некоторые механизмы, лежащие в основе адаптации к облучению. При анализе структуры биоты на территориях

с высоким уровнем радиационного фона (0,5–1 Гр/год) было выяснено, что в ее структуре доминируют виды некоторых микроскопических грибов, отличающихся повышенным содержанием меланина.

По-видимому, адаптивное значение этого признака обусловлено высокой радиопротекторной активностью меланина, способного служить перехватчиком свободных радикалов. Анализ приспособляемости природных популяций арабидопсиса из районов с разными уровнями загрязнения вокруг ЧАЭС в период 1986–1992 гг. выявил устойчивость потомков облученных растений к большим концентрациям мутагенов.

Аналогичные факты были выявлены и для других представителей флоры и фауны. Механизмы, лежащие в основе адаптации, чрезвычайно разнообразны: повышенное накопление антиоксидантов, активация системы репарации и другие механизмы.

Например, у арабидопсиса, произрастающего на радиоактивно-загрязненных территориях, обнаружено более чем десятикратное снижение частоты гомологичной рекомбинации, а также повышение уровня метилирования ДНК. С одной стороны, низкий уровень рекомбинации предотвращает увеличение частоты генетических перестроек, с другой стороны – подавляет репарацию двунитевых разрывов ДНК.

Возможно, у растений, произрастающих в загрязненных районах, происходит перестройка репарации на более быстрый, но ошибочный механизм негомологичной рекомбинации. Метилирование же существенно меняет активный профиль ДНК посредством эпигенетических изменений. Отсюда вытекает предположение о том, что именно эпигенетическая регуляция, приводящая к стабилизации генома, играет основную роль в адаптации. Гиперметилирование в этом случае можно рассматривать как стресс-ответ и основной механизм защиты растений, предотвращающий геномные перестройки.

Некоторые виды птиц, отловленные в 30-километровой зоне ЧАЭС, имеют повышенную частоту мутаций частичного альбинизма по сравнению с уровнем мутаций, имевшим место до радиоактивного загрязнения территорий, и с уровнем мутаций на контрольном участке.

Данный тип мутаций связан со снижением содержания в перьях каротиноидов, что свидетельствует о чрезвычайной восприимчивости метаболизма этих пигментов к облучению. Кроме того, воздействие облучения может приводить к снижению внутриклеточного уровня каротиноидов, используемых благодаря их антиоксидантной активности для деактивации свободных радикалов.

Динамика популяционного мутагенеза в течение 22 последовательных поколений и генетическая радиоадаптация исследовались также в природных популяциях рыжей полевки (Myodes glareolus). В облученных популяциях было обнаружено два противоположно направленных

процесса: накопление мутаций (генетического груза популяции) и формирование генетической радиоадаптации. Предпологается, что частота генетических нарушений в популяции могла бы быть выше в случае отсутствия процессов радиоадаптации.

С эволюционной точки зрения оптимальная адаптация к условиям среды достигается за счет перераспределения энергетических и пластических ресурсов организма между жизненно важными потребностями, такими как рост, размножение и поддержание физиологической жизнедеятельности. В неблагоприятных условиях поддержание жизнедеятельности становится энергетически не выгодным и все затраты направляются на размножение. В пользу этого свидетельствуют результаты некоторых радиоэкологических исследований.

Так, у полевок-экономок (Microtus oeconomus Pall.) длительно обитающих на участках с повышенным содержанием соединений урана, радия и тория, и у их потомков, полученных уже в условиях вивария, увеличиваются показатели плодовитости. Повышение фертильности отмечается также у людей, проживающих на территориях с повышенным радиационным фоном.

Популяции Drosophila melanogasler из различных районов Республики Беларусь с повышенным уровнем радиационного фона по сравнению с популяциями контрольных зон имеют увеличенную частоту летальных мутаций и возросшую гетерозиготность. В природных популяциях дрозофилы наблюдается нарастание адаптации к неблагоприятным экологическим факторам, таким как ИИ и химическое воздействие. После их помещения в стандартные условия лабораторного содержания без указанных воздействий адаптация сохраняется до 10 поколений без облучения. В условиях лабораторного содержания, обладающего, по мнению авторов, стрессирующим действием, даже популяции на контрольных участках становятся более радиоустойчивыми.

Эволюционные аспекты высокого мутационного давления исследовались на лабораторных популяциях Drosophila melanogaster. У популяций, облучаемых на протяжении свыше 600 поколений в дозах 20, 40 и 80 Гр за поколение, наблюдалось ступенчатое снижение радиочувствительности с повышением дозы облучения. У облучаемых на протяжении многих поколений лабораторных популяций дрозофилы отмечается повышение устойчивости не только к действию ИИ, но и параллельно к мутагенам химической природы.

Таким образом, полученные на природных и лабораторных популяциях данные свидетельствуют о нарастании генетически обусловленной радиоустойчивости и активации процессов отбора устойчивых фенотипов в ответ на стресс-факторы. При этом реакции организмов носят универсальный характер и повышают их резистентность к широкому перечню неблагоприятных воздействий.

Так, оказалось, что наибольшей радиорезистентностью к воздействию ИИ обладают организмы, приспособленные к жизни в неблагоприятных условиях среды, сопряженных с высоким уровнем повреждений ДНК. В первую очередь это относится к организмам, способным выживать после полного обезвоживания. Экстремально высокой устойчивостью к повреждающему действию ионизирующей радиации характеризуются бактерии родов Deinococcus, Geodermatophilus и Hymenobacter. Особую известность получила бактерия Deinococcus radiodurans, которая способна существовать в условиях хронического облучения с мощностью дозы 60 Гр/ч, а также переносить острое гамма-облучение в дозе до 15 000 Гр. Как показали исследования последних лет, устойчивость Deinococcus radiodurans к облучению и другим неблагоприятным факторам обусловлена по крайней мере тремя причинами:

- эффективностью процесса репарации ДНК;
- системой защиты от активных форм кислорода;
- особенностями строения клеточной стенки.

Облучение в дозах, которые способна пережить D. radiodurans, вызывает сотни одно- и двунитевых разрывов ДНК, многочисленные повреждения оснований. В то время как клетки большинства огранизмов не могут восстановиться уже после двух-трех двунитевых разрывов ДНК, у D. radiodurans индукция до 100 двунитевых разрывов ДНК на каждую из шести копий плазмид и четырех копий хромосом не приводит в итоге к повышению уровня летальности и мутагенеза. Критическим элементом в механизме радиоустойчивости D. radiodurans является ДНК-полимераза типа А (PolA). Для эффективной работы PolA нуждается в ионах Mg^{2+}, которые модулируют ее активность и помогают возобновлению синтеза ДНК в случае его остановки на поврежденном участке. Концентрация в клетке Mg^{2+} коррелирует с радиоустойчивостью D. radiodurans.

Возможно, устойчивость бактерии обусловлена наличием определенного эволюционно выработанного универсального механизма репарации множественных разрывов, поскольку при естественном для D. radiodurans полном обезвоживании также происходит множественная фрагментация ДНК. Более эффективной репарации способствует также наличие в бактериальном геноме множественных копий плазмид и хромосом, между которыми происходят интенсивные процессы гомологичной рекомбинации. Во время репарации каждая плазмида может участвовать в шести, а хромосома – более чем в 700 рекомбинационных событиях. Ведущая роль в гомологичной репарации D. radiodurans принадлежит белку RecD. Кроме того, RecD принимает участие в процессах антиоксидантной защиты, стимулируя активность каталазы и перехватчиков свободных радикалов.

Сравнение последовательностей ДНК генома D. radiodurans с другими организмами выявило несколько интересных особенностей, частично объясняющих механизмы ее радиоустойчивости. Гены, участвующие в контроле репарации и рекомбинации ДНК, а также стресс-ответе, были исследованы у этого организма достаточно детально. По-видимому, некоторые из этих генов попали в геном D. radiodurans от эукариот благодаря вертикальному переносу, так как они не встречаются в геномах других бактерий.

Например, были идентифицированы три белка, гомологичные белкам устойчивости растений к засухе, наличие которых коррелирует с радиоустойчивостью. Данные факты однозначно свидетельствуют о том, что эффективность репарации ДНК у данного организма обусловлена несколькими различными биологическими механизмами. В связи с недостаточной изученностью вопроса в настоящее время не представляется возможным оценить эффективность этих механизмов в полной мере и дать заключение о целостной картине их действия.

Возможно, механизм детоксификации свободных радикалов D. radiodurans связан с необычно высокой концентрацией ионов Mn^{2+} по отношению к концентрации ионов Fe^{2+} во внутриклеточной среде микроорганизма. В отличие от радиочувствительной бактерии Shewanella oneidensis в цитоплазме D. radiodurans содержание Mn^{2+} увеличено в 300 раз, в то время как содержание ионов Fe^{2+} снижено в 3 раза. Защитный эффект Mn^{2+}, по-видимому, обусловлен его способностью перехватывать радикал супероксида. В противоположность Mn^{2+} ионы Fe^{2+} в условиях облучения вступают в реакцию Фентона и способствуют образованию радикалов гидроксила и супероксида. Кроме того, описанный механизм может защищать не только ДНК, но и белки, вовлеченные в систему репарации, а хорошо известно, что стабильность генетического материала находится в прямой зависимости от радиорезистентности белкового комплекса системы репарации.

Дополнительным приспособлением, которое способствует повышенной радиоустойчивости D. Radiodurans, является сложная многослойная клеточная стенка, включающая наружную мембрану и толстый пептидогликановый слой, содержащий аминокислоту орнитин.

Приспособленность к выживанию в условиях обезвоживания, когда ДНК подвергается многочисленным разрывам, по-видимому, определяет устойчивость D. radiodurans к облучению, так как сходство процессов восстановления предполагает наличие общих механизмов. Вероятно, этот феномен имеет общебиологическое значение. Так, недавно обнаружены засухоустойчивые организмы, относящиеся к типу коловраток, классу Bdelloidea, которые также имеют чрезвычайную устойчивость к облучению: коловратки Adineta vaga и Philodina roseola способны переживать облучение в дозе 1120 Гр, в то время как неустойчивый к засухе вид Euchlanis dilatata имеет в 5 раз меньшую радиоустойчивость.

Следовательно, при адаптации к повреждающему действию радиации ведущее значение могут иметь универсальные механизмы устойчивости к хроническому действию любых генотоксических факторов (например, УФ-излучение или окислительные агенты) или нестатичных условий среды (например, циклы засухи и увлажнения или циклы высоких и низких температур).

Таким образом, можно заключить, что в генотипе любого достаточно высокоорганизованного биологического организма существует динамический баланс между уровнем индукции мутаций и эффективностью механизмов защиты генетического материала (рис. 9.3).

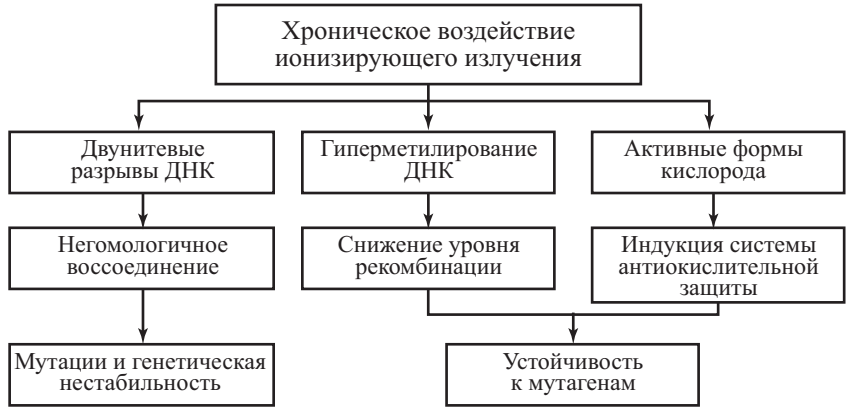

Рис. 9.3. Возможная схема механизма генетической адаптации к мутагенному действию ионизирующего излучения с учетом уровня мутационного давления и эффективности системы репарации

Увеличение мутагенной нагрузки в результате действия облучения или другого неблагоприятного фактора приводит к подавлению генетической рекомбинации и переключению системы репарации ДНК на более быстрый, но работающий с ошибками путь, ведущий к росту генетического груза, но обеспечивающий индивидууму выживание в нестандартных условиях.

Не менее важную роль в радиоадаптации играет повышение активности системы деактивации свободных радикалов, достигаемое за счет увеличения содержания в клетке каротиноидов и ионов Mn^{2+} (бактерии), меланина (грибы) или других биологически активных веществ с аналогичной активностью.

Подводя итог рассмотренным явлениям, следует подчеркнуть, что ИИ может вызывать генетические и эпигенетические изменения в герминальных клетках родителей, детерминирующие или предрасполагающие к различным патогенным состояниям у потомков:

- тератогенез;
- повышенная частота заболеваемости;
- снижение продолжительности жизни.

При длительном существовании популяции в условиях облучения может формироваться, напротив, состояние радиоадаптации, которое определяется, с одной стороны, активацией различных форм репарации, с другой стороны – ускоренным размножением с последующей позитивной селекцией адаптированных форм за счет естественного отбора. Однако при оценке риска воздействия важными являются не только возможные последствия облучения в потомстве, но и непосредственные и отдаленные эффекты облучения малыми дозами ИИ в соматических клетках, особенно в том случае, если речь идет о человеке.

Контрольные вопросы

1. Почему большинство организмов в процессе эволюции не выработало приспособления к высокими дозами облучения?
2. Какое явление понимают под адаптацией к ИИ?
3. Какие примеры особей, устойчивых к действию высоких доз ИИ, можно привести? Каковы возможные механизмы радиоадаптации?
4. К каким результатам привели исследования динамики мутагенеза и генетической радиоадаптации у Myodes glareolus, Microtus oeconomus Pall. и Drosophila melanogasler?
5. Какими причинами обусловлена устойчивость Deinococcus radiodurans к облучению? Каков возможный механизм радиоустойчивости данного вида бактерий?
6. Какую возможную схему механизма генетической адаптации к мутагенному действию ионизирующего излучения для высокоорганизованного биологического организма можно начертить?
7. К каким патогенным состояниям у потомков могут привести генетические и эпигенетические изменения в герминальных клетках родителей, вызываемые ИИ?
8. При каких условиях формируется и чем определяется состояние радиоадаптации в популяциях живых организмов?

9.3. Внутриутробные эффекты облучения

В то время как последствия облучения, приводящие к развитию раковых заболеваний, проявляются в органах людей, непосредственно подвергшихся воздействию ИИ, наследственные эффекты возникают в

результате повреждения ДНК половых клеток (сперматозоидов и яйцеклеток) в репродуктивных органах (семенниках у мужчин и яичниках у женщин) тех лиц, которые также подверглись воздействию ИИ.

Если повреждения ДНК результируются в мутации в половых клетках, то они могут передаться по наследству потомкам облученного человека и далее будущим поколениям. Нарастание уровня этих мутаций непосредственно приведет к росту доминантных наследственных заболеваний.

Другие мутации проявляются косвенно в результате взаимодействия с иными генами, и здесь возникновение хронических полифакторных заболеваний в существенной степени будет зависеть от образа жизни или экологических факторов (так называемые мультифакторные заболевания с наследственной предрасположенностью). В любом случае оба класса таких заболеваний возникают естественным образом, способствуя появлению наследственных дефектов у детей. В некоторых случаях облучение родителей может результироваться во врожденные аномалии развития. В то же время исследования частоты возникновения врожденных пороков развития у большого числа новорожденных детей в районах с высоким уровнем естественного радиоактивного фонового излучения в Индии и Китае не свидетельствуют об увеличении такой частоты.

Самыми наглядными примерами передающихся по наследству последствий воздействия ИИ являются результаты широких экспериментальных исследований на животных с использованием больших доз, проведенных, в частности, на лабораторных мышах. Как правило, эти эксперименты весьма доказательны.

Воздействие ИИ на развивающийся эмбрион / плод во время беременности также может способствовать возникновению у детей неонкологических заболеваний. Помимо появления врожденных пороков развития сильному воздействию подвергается центральная нервная система нерожденного человека. Риски здесь обусловлены двумя основными факторами:

- дозой облучения;
- конкретным этапом развития эмбриона / плода во время воздействия ИИ.

Основываясь на результатах исследований главным образом на животных и немногочисленных случаях беременных женщин, получивших достаточно большую дозу ИИ, МКРЗ пришла к выводу, что порог для возникновения подобных последствий составляет порядка 100 мГр.

Есть подтверждения того, что риск возникновения широко распространенных заболеваний с наследственной предрасположенностью, помимо рака, может увеличиться после воздействия ИИ в широком

диапазоне доз, по крайней мере от умеренных до высоких доз ИИ. Основным источником свидетельств этого являются также данные эпидемиологических исследований по лицам, пережившим атомные бомбардировки в Японии, и в частности исследований, сконцентрированных на заболеваниях органов кровообращения. В своем докладе за 2006 г. МКРЗ представила анализ данных, полученных как в ходе обследования лиц, переживших атомные бомбардировки, так и в ходе изучения других групп населения, подвергшихся облучению. При проведении этого анализа возник ряд трудностей, среди которых в качестве ведущих можно отметить следующие:

• высокая общая частотность возникновения этих заболеваний у групп населения, не подвергавшихся воздействию ИИ;

• внесение соответствующей поправки на действие других факторов помимо радиационного облучения (например, курение, уровень холестерина, наследственная предрасположенность);

• отсутствие доказательно установленных клеточных механизмов, обусловливающих их развитие.

Единственными четкими доказательствами повышенного риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний в связи с воздействием ИИ в дозах ниже 1–2 Гр являются также данные по лицам, пережившим атомные бомбардировки.

Другие исследования, которые были изучены МКРЗ, также свидетельствуют о росте сердечно-сосудистых заболеваний при облучении человека в более высоких дозах.

Для прочих неонкологических заболеваний в общей совокупности справедлив тот же общий вывод, который был сделан в отношении сердечно-сосудистых заболеваний; кроме того, проведенный МКРЗ анализ не позволил сделать какие-либо выводы о прямой причинно-следственной связи между облучением в дозах ниже 1–2 Гр и повышенной частотой возникновения сердечно-сосудистых и прочих неонкологических заболеваний, а в области малых доз для этих заболеваний взаимосвязь между дозой и эффектом вообще пока неясна и является в настоящее время объектом интенсивного изучения.

Необходимо также отметить, что в ходе последних эпидемиологических исследований, в частности связанных с изучением последствий аварии на ЧАЭС, появились данные, свидетельствующие, правда, пока с недостаточной степенью доказательности, о возможном повышенном риске возникновения неонкологических заболеваний при облучении дозами ниже 1–2 Гр, а в некоторых случаях и гораздо меньшими дозами. Однако механизмы этого явления еще совершенно неясны, и оценка рисков при малых дозах по-прежнему проблематична.

В 2006 г. МКРЗ также произвела оценку воздействия ИИ на иммунную систему. В принципе, известно, что различные дозы ИИ способствует либо повышению, либо снижению потенциала организма в отношении формирования иммунологической реакции на инфекцию, онкологическое или иное заболевание. Кроме того, еще в ранних работах Р.В. Петрова было показано, что ИИ способны индуцировать у экспериментальных животных аутоиммунитет против собственных антигенов. МКРЗ были изучены материалы многих исследований по выявлению эффектов ИИ на иммунитет, но по-прежнему невозможно сделать четкий и окончательный вывод относительно того, способно ли ИИ в малых дозах активизировать или подавлять иммунологические реакции.

И наконец, МКРЗ отмечает, что, как показывают последние исследования, увеличение частотности возникновения катаракты может быть также связано с воздействием ИИ в малых дозах на глаз человека. На протяжении уже ряда лет возникновение таких нарушений в хрусталике глаза считалось следствием воздействия только высоких доз облучения. Продолжают также интенсивно изучаться и механизмы, которые могут иметь отношение к объяснению заболеваний, вызываемых ИИ, таких, например, как геномная нестабильность и эффект «свидетеля», равно как и новые концепции и технологии, которые могли бы способствовать лучшему пониманию последствий воздействия ИИ в малых дозах на здоровье человека, а также биологических механизмов, которые объясняют такие последствия.

Контрольные вопросы

1. В результате каких повреждений возникают наследственные эффекты у людей, подвергшихся воздействию ИИ?
2. На основании каких исследований и какой дозовый порог был установлен МКРЗ для появления врожденных пороков?
3. Какие трудности возникли при анализе данных, полученных при обследовании групп населения, подвергшихся облучению, согласно докладу МКРЗ за 2006 г.?
4. К каким выводам пришли специалисты МКРЗ в результате оценки воздействия ИИ на иммунную систему живых организмов?
5. Какие нарушения в хрусталике глаза может вызвать ИИ?

Глава 10

РАДИАЦИОННЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ

10.1. Эпидемиологические аспекты оценки заболеваемости раком

Термин «рак» – это общий термин, используемый для описания серьезных системных нарушений в делении, дифференцировке и элиминации клеток в органах и тканях. Обычно клетки нормально делятся и дифференцируются, а затем, отработав свой срок, скоординировано элиминируются с тем, чтобы сформировать органы и ткани организма, но аномальный рост и задержки в дифференцировке могут привести к возникновению аномальной, неуправляемой массы клеток в данном органе, которая известна как солидное новообразование. Такой аномальный рост или развитие клеток костного мозга и лимфатических сосудов может вызвать соответственно лейкемию и лимфому. В зависимости от того или иного органа неконтролируемый рост новообразования и дальнейшие клеточные изменения могут привести к развитию злокачественных новообразований.

Есть много полученных в ходе эпидемиологических исследований подтверждений того, что воздействие на людей ионизарующего излучения в умеренных и высоких дозах может привести к росту частоты встречаемости солидных новообразований во многих органах человеческого организма и лейкемий. Появляется также все больше информации о клеточных и молекулярных механизмах возникновения и возможного развития онкопатологии.

Раковые заболевания возникают по многим причинам, это серьезная и широко распространенная проблема, на них приходится около четверти смертей в развитых странах и все больше смертей в развивающихся странах. Однако если рост заболеваемости раком, вызванный высокодозовыми воздействиями, является бесспорным фактом, то в случае воздействия ионизирующего излучения в малых дозах он является достаточно спорными.

На протяжении ряда лет МКРЗ использовала систему скользящих обзоров всех исследований, связанных с изучением заболеваемости раком, вызванных воздействием ионизирующего излучения, среди групп населения, подвергшихся облучению. Особое внимание уделялось формированию правильного дизайна исследований, в том числе анализу влияния на конечный результат различных побочных факторов и статистической обоснованности любого такого исследования с тем, чтобы

составить реальную картину, описывающую прирост раковых заболеваний, вызванных воздействием ионизирующего излучения в облученной популяции. МКРЗ анализировала статистическую обоснованность исследований, вероятность системных погрешностей и другие причины неопределенности, включая и те, что связаны с полученными дозами облучения.

Источником эпидемиологической информации о заболеваемости раком, индуцируемой воздействием ИИ, служат результаты обследования людей, переживших атомные бомбардировки в Японии, групп, подвергавшихся воздействию ионизирующего излучения в силу своей профессиональной занятости, пациентов, получивших облучение в ходе медицинских процедур, и людей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения из природных источников.

В последние годы удалось также выявить рост заболеваемости раком легких у людей, подвергшихся облучению дома в результате воздействия присутствующего в естественных условиях радиоактивного газа радона и его производных.

Анализируя все эти исследования, МКРЗ пришла к выводу, что единым наиболее информативным сводом данных о воздействии всех видов ионизирующего излучения являются обследования лиц, переживших атомные бомбардировки в Японии в 1945 г. В ходе атомных бомбардировок люди подвергались воздействию главным образом γ-излучения с высокой мощностью дозы при небольшом вкладе воздействия нейтронов. МКРЗ использовала эти данные для оценки рисков возникновения солидных раковых заболеваний в результате воздействия ионизарующего излучения, а также их влиянии на формирование риска развития лейкемий и лимфом.

Хоть статистические и другие факторы неопределенности ограничивают возможности анализа всех имеющихся данных, тем не менее удалось изучить основные тенденции, характерные для радиационных рисков, связанных с полом, возрастом на момент облучения, а также временем, прошедшим с момента облучения; анализировался также и вопрос о том, как могут различаться такие риски для жителей различных регионов мира. Для одних видов рака к настоящему времени нет никаких подтверждений повышенного риска их возникновения на фоне воздействия ионизирующего излучения, в то время как для других повышенный риск проявляется только после воздействия ионизирующего излучения в больших дозах.

На рисунке 10.1 представлена различная восприимчивость к развитию солидного рака в 13 различных органах человеческого организма на основе данных о смертности среди людей, переживших атомные бомбардировки в Японии. Как видно из рисунка, существуют большие различия в риске возникновения рака различных органов.

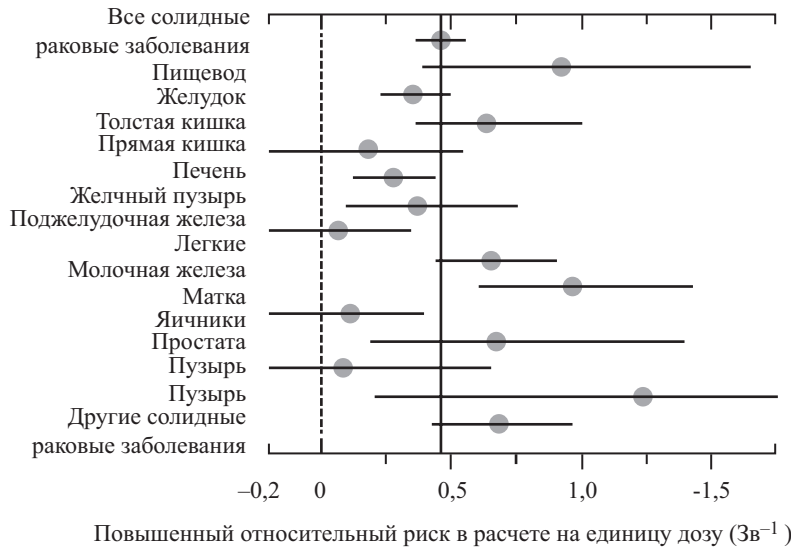

Рис. 10.1. Оценки риска смертности от солидных раковых заболеваний с разбивкой по различным органам, которые были получены при исследовании данных по людям, пережившим атомные бомбардировки в Японии

Для изучения взаимосвязи между полученной дозой облучения и риском возникновения рака, т.е. взаимосвязи между дозой и эффектом, МКРЗ использовала эпидемиологические данные. Повышенный сравнительный риск – это показатель возрастания риска возникновения рака в обследуемых группах населения в результате воздействия ионизирующего излучения в определенных дозах (большее число свидетельствует о более высоком риске). Самую четкую картину этой взаимосвязи в совокупности для всех видов солидных раковых заболеваний дают данные по лицам, пережившим атомные бомбардировки в Японии; эта информация суммирована на рис. 10.2.

Взаимосвязь между дозой и эффектом для уровня смертности при облучении в малых дозах можно описать с помощью как линейной, так и нелинейной функции. Статистически значимые оценки риска отмечаются при дозах 100–200 мГр и выше. Однако одни только эпидемиологические исследования вряд ли смогут дать серьезные результаты оценки риска при дозах гораздо ниже этих уровней. Получение на основе всех информативных исследований общей оценки риска возникновения рака в результате воздействия ионизирующего излучения на протяжении всей жизни представляет собой чрезвычайно сложный процесс.

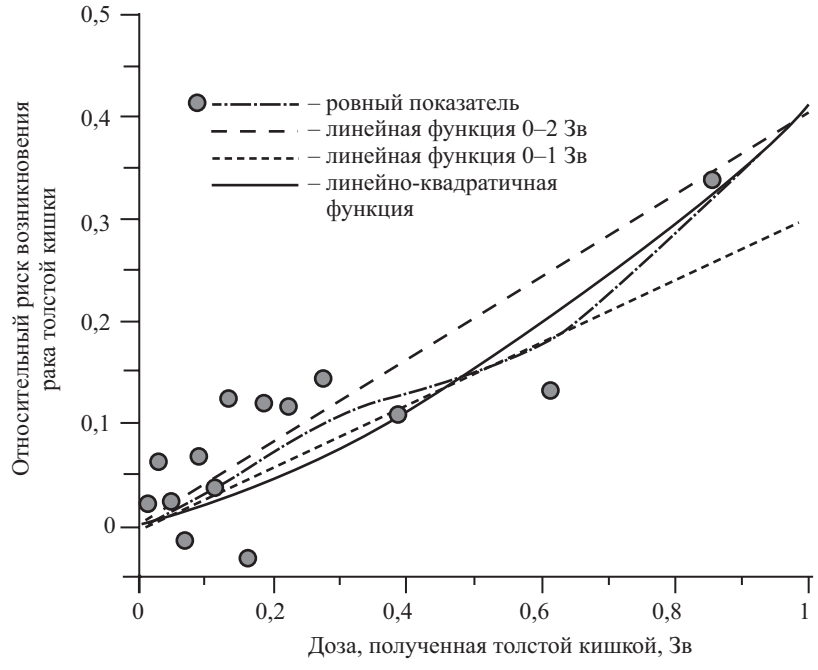

Рис. 10.2. Реакция на дозу облучения солидных раковых заболеваний со смертельным исходом на основе проведенных в 2002 г. обследований лиц, переживших атомные бомбардировки в Японии

Представленные МКРЗ текущие оценки риска возникновения смертельных раковых заболеваний в результате воздействия ионизирующего излучения суммированы в табл. 10.1.

Таблица 10.1. **Повышенный риск смертности на протяжении всей жизни (в среднем по обоим полам)* по данным МКРЗ**

Доза острого облучения (Гр)	Солидные раковые заболевания в целом (процент при конкретной дозе)	Лейкемия (процент при конкретной дозе)
0,1	0,36–0,77	0,03–0,05
1,0	4,3–7,2	0,6–1,0

* Повышенный риск смертности на протяжении всей жизни в размере 1,0% означает один дополнительный случай на 100 человек.

Оценки риска меняются в зависимости от возраста облученных, причем молодежь имеет больший уровень рисков; исследования воздействия ионизирующего излучения во время внутриутробного развития показывают, что в этом плане эмбрион особенно чувствителен, причем повышенный риск отмечается уже при дозах 10 мГр и выше.

Картина воздействия ионизирующего излучения на лиц, переживших атомные бомбардировки в Японии, весьма существенно отличается от того, что мы имеем, анализируя большинство исследований групп людей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения либо на рабочем месте, либо из природных источников. Люди, пережившие атомные бомбардировки, подверглись воздействию внешнего излучения преимущественно за счет γ-лучей и нейтронов, как правило, в больших дозах в течение короткого периода времени. Многие же представители других групп, наоборот, подвергались воздействию малых доз в течение длительного времени, а иногда воздействие было вызвано радионуклидами, попавшими внутрь организма.

Ценную информацию об эффектах долгосрочных воздействий радионуклидов, попавших внутрь организма, в малых дозах дали эпидемиологические исследования состояния здоровья работников ядерного комплекса «Маяк» на Южном Урале в России, а также населения, проживающего в районе реки Теча, которое подверглось воздействию ионизирующего излучения в результате сброса радиоактивных отходов с этого предприятия в реку.

Наблюдения за лицами, подвергшимися воздействию ионизирующего излучения в результате аварии на ЧАЭС, также позволили получить весьма полезную информацию о влиянии воздействий внешнего облучения в малых дозах на организм человека и о последствиях воздействия на щитовидную железу радиоактивных нуклидов йода. В целом оценки риска развития рака, полученные в ходе этих исследований, мало отличаются от результатов, полученных при обследовании лиц, переживших атомные бомбардировки в Японии.

И наоборот, обследования жителей тех районов Китая и Индии, где отмечается повышенная естественная фоновая радиация, хоть и вызывают большие сомнения в отношении качества исследований как таковых, но в целом не свидетельствуют о том, что ионизирующее излучение при таких уровнях увеличивает риск возникновения рака. Эти и другие исследования дают все новую и новую информацию.

Контрольные вопросы

1. Какие группы людей являются источником эпидемиологической информации о заболеваемости раком, индуцируемой воздействием ИИ?

2. Обследования какой категории лиц является наиболее информативным сводом данных о воздействии всех видов ионизирующего излучения? Почему?
3. О чем свидетельствуют данные, приведенные на рис. 10.1?
4. С помощью каких функций можно описать взаимосвязь между дозой и эффектом для уровня смертности при облучении в малых дозах? Какие примеры можно привести?
5. От каких факторов зависят оценки риска возникновения смертельных раковых заболеваний в результате воздействия ионизирующего излучения?
6. Чем обусловлены существенные различия воздействия ионизирующего излучения на лиц, которые пережили атомные бомбардировки в Японии, групп людей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения на рабочем месте или из природных источников?
7. Какие эпидемиологические исследования дали ценную информацию об эффектах долгосрочных воздействий радионуклидов, попавших внутрь организма человека, а также о влиянии на него воздействий внешнего облучения в малых дозах?

10.2. Анализ механизмов радиационно-индуцированной онкопатологии

Понимание механизмов развития рака вследствие воздействия ионизирующего излучения может помочь в расшифровке эпидемиологических данных, в частности в отслеживании тенденций при оценке рисков для малых доз и доз низкой мощности.

В течение многих лет исследования по индукции рака давали все новые подтверждения того, что этот процесс, как правило, начинается с изменения (мутации) одного или нескольких генов. Последующее развитие рака и возникновение злокачественной опухоли предположительно проходит в несколько этапов, и это также связано с мутацией (мутациями) или другими изменениями клеточных генов.

Международная комиссия по радиациологической защите изучила выводы такого рода исследований, а также многих других работ, ориентированных на изучение последствий воздействия ионизирующего излучения на клеточном и субклеточном уровнях. Современное понимание проблемы заключается в том, что энергия, полученная клеткой после облучения, может привести к повреждению всех внутриклеточных компонентов.

Главной внутриклеточной мишенью изменений, вызванных ИИ, являются молекулы ДНК, в которых закодировано порядка 25 000–35 000 генов, которые координируют все функции в каждой клетке, и если не устранить повреждение, причиненное ионизирующим излучением гену (или группе генов), клетка может погибнуть. Клетка может и

выжить, однако произойдут мутации ДНК, которые повлияют на поведение клетки. Даже небольшая часть таких мутаций может привести к развитию рака. У клеток есть ряд специальных систем восстановления ДНК, которые помогают устранить многие формы ее повреждения, возникшие случайно в процессе жизнедеятельности клетки или под воздействием внешних факторов.

Самые последние исследования того, как ИИ приводит к повреждению ДНК клеток, а также клеточных систем, которые распознают и устраняют повреждения, включая биологические эффекты вызванных ИИ мутаций ДНК, позволяют в новом свете взглянуть на вероятные механизмы развития рака.

Подобные повреждения ДНК трудно устранить надлежащим образом, и даже при малых дозах радиации есть пусть и очень малая, но не нулевая вероятность возникновения мутаций ДНК, которые увеличивают риск развития рака.

Поэтому имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют в пользу беспороговой реакции на мутационный компонент, вызывающий развитие рака под воздействием ИИ в малых дозах и (или) при воздействиях низкой дозовой мощности. Информация о характере индуцированных ИИ мутаций показывает, что процесс потери генетической информации, скорее всего, будет доминировать в этой составляющей компоненте мутаций.

Есть также подтверждения того, что снижение риска заболевания раком при определенном воздействии ИИ в малых дозах и при низкой дозовой мощности по сравнению с большими дозами и высокой дозовой мощностью связано, по крайней мере отчасти, с возможностями клетки репарировать повреждения ДНК после радиационного облучения. Для того чтобы учитывать относительное снижение воздействия облучения в малых дозах и воздействий низкой дозовой мощности, часто используется поправочный коэффициент, известный как коэффициент воздействия дозы и дозовой мощности, однако в докладе МКРЗ за 2006 г. для экстраполяции оценочных рисков при малых дозах была использована непосредственно линейно-квадратичная модель, и соответственно коэффициент воздействия дозы и дозовой мощности не применялся.

Возникновение и развитие рака после облучения – это не просто вопрос постепенного накопления мутаций в ДНК соответствующих клеток, а ключевой момент каскада последующих взаимосвязанных событий, результирующихся в конечном счете в опухолевую клетку – родоначальницу раковой опухоли. Проводились исследования и для проверки следующих гипотез:

• адаптация клеток и тканей к малым дозам ИИ может сделать их более устойчивыми к развитию рака (адаптивная реакция);

• воздействие ИИ на иммунные системы, которые распознают и уничтожают аномальные клетки, может повлиять на вероятность развития рака;

• дополнительная доза ИИ может обусловить изменения, которые приведут к долгосрочным и передающимся из поколения в поколение последствиям для устойчивости клеточной ДНК (геномная нестабильность) и (или) вызовут передачу сигналов от поврежденных клеток к их неповрежденным соседям (эффект «свидетеля»); высказывалось предположение, что и геномная нестабильность, и эффект «свидетеля», возможно, являются теми факторами, которые изменяют вероятность возникновения рака в результате облучения. Эти и другие модулирующие факторы, как, например, возникновение воспалительных реакций, могут вести как к росту, так и к снижению риска развития рака в результате воздействия радиации.

Иммунная система, ответственная за поддержание генетического гомеостаза организма, является одним из основным барьеров на пути развития онкопатологии.

В то же время она представляет собой одну из наиболее экологически сенситивных систем организма, что позволяет использовать ее в качестве маркера экологической ситуации.

Хорошо известно, что чувствительность организма в целом и его отдельных органов определяется сложностью их организации. Совершенно очевидно, что более сложно организованные многокомпонентные системы, стабильность которых поддерживается за счет взаимодействия многих разнонаправленных процессов, легче выходят из равновесия и, как следствие, оказываются более чувствительными к любым дестабилизирующим факторам. Таким образом, можно констатировать, что чувствительность любой системы прямо пропорциональна степени сложности ее организации. Это положение применимо в первую очередь к тем органам и системам организма, которые можно отнести к разряду суперсистем.

Термин «суперсистема» означает высоко интегрированную живую систему. Если системы механистического типа представляют собой набор различных элементов, которые объединены и скоррегированы таким образом, что образуют единое целое, предназначенное для выполнения определенных функций, то суперсистема способна воспроизводить свои элементы из общего прегинитора. Многообразие элементов суперсистемы формируется в результате адаптации и коадаптации, и, как следствие, она представляет собой саморегулирующуюся и самоорганизующуюся систему.

С одной стороны, это закрытая самообновляющаяся система, с другой стороны – система, открытая для сигналов из вне, способная трансформировать их во внутренние сигналы и использовать для саморегуляции и экспансии.

Примером такого типа структур может быть иммунная система. Она формируется и развивается как типичная суперсистема, прототипом которой может служить процесс эмбриогенеза или эволюционный процесс в целом. Как правило, любая суперсистема характеризуется несколькими основными критериями, к числу которых можно отнести следующие:

- суперсистема состоит из многих различных компонентов, или элементов;
- компоненты взаимосвязаны и скоординированы для выполнения единой функции;
- суперсистема предназначена для выполнения конкретных, специализированных задач.

Как правило, суперсистема изначально представлена только определенной формой плюро- или тотипотентных предшественников. Пул последних постепенно увеличивается за счет деления клеток (причем этот процесс часто имеет стохастический характер), а поздние генерации формируют на поверхности специфические рецепторы.

Прогениторы (предшественники) не имеют какой-либо предварительно запрограммированной взаимосвязи. Напротив, они начинают формировать разнообразные взаимосвязи в процессе взаимодействия, используя свои рецепторы и адгезионные молекулы. Те из них, которые в состоянии взаимодействовать с другими окружающими их клетками, выживают, дифференцируются и в дальнейшем формируют более зрелые типы; клетки, которые оказываются не в состоянии адаптироваться и взаимодействовать со своим окружением, погибают (отбор посредством самоадаптации). При этом окружающие клетки также адаптируются к вновь сформировавшимся посредством обмена с ними различным сигналам (коадаптация). Селекция посредством самоадаптации и коадаптации является основным принципом самоорганизации суперсистем и лежит в основе нормального формирования иммунной системы.

Однако если система складывается только посредством механизмов адаптации и селекции, она неизбежно превратится в самообеспечивающуюся закрытую систему. В то же время реальная суперсистема постоянно модернизируется под влиянием внешних сигналов, к числу которых относятся гормоны, цитокины, адгезионные молекулы, антигены и другие факторы, которые воспринимаются клеточными рецепторами. Рецепторы используются для преобразования внешнего сигнала во внутренний, активирующий в дальнейшем соответствующие гены. Часто рецепторы внешних сигналов идентичны рецепторам, опосредующим самоадаптацию. Таким образом, суперсистема сочетает «открытость» с «закрытостью» посредством использования одних и тех же рецепторов для различных целей. Например, иммунная система использует один и тот же TCR-комплекс как для внутренней селекции по принципу распознавания собственных антигенов, так и для контакта с внешними чужеродными антигенами. В результате этих самоконтролируемых ответов на внешний сигнал суперсистема формирует свой собственный профиль поведения, который в свою очередь формирует «самоспецифичность» индивидуальной суперсистемы.

Благодаря такой сложной системе регуляции иммунная система тесно взаимосвязана с другими регуляторными системами организма, и в первую очередь с нервной и эндокринной системами, формируя единую комплексную нейро-иммуно-эндокринную суперсистему. Функционирование этой суперсистемы регулируется тотипотентными биологически активными молекулами – нейромедиаторами, нейропептидами, гормонами, а также ими же продуцируемыми медиаторами, которые вызывают взаимные трофические эффекты (фактор роста нервов, инсулиноподобные вещества, цитокины, ИЛ-6 и др.).

Все компоненты этой комплексной суперсистемы функционируют на основе взаиморегуляции, и срыв функционирования в одном из ее звеньев в той или иной мере неизбежно сказывается на остальных.

Приведенные выше рассуждения дают основания сделать вывод о том, что нарушения иммунного статуса у лиц, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС, являются результатом нарушения в первую очередь скоррегированного взаимодействия компонентов этой комплексной суперсистемы. В этом смысле причиной нарушения иммунного гомеостаза могут выступать как само радиационное воздействие, так и, например, пострадиационный и психоэмоциональный стрессы. Параллельно с этим у пострадавших лиц найдены изменения функции гипофизарно-адреналового и тиреоидного звеньев нейроэндокринной системы, что еще раз подчеркивает тесную взаимосвязь различных структур этой комплексной суперсистемы.

Контрольные вопросы

1. Для проверки каких гипотез возникновения и развития рака проводились исследования?
2. Какая система организма человека может быть использована в качестве маркера экологической ситуации? Почему?

3. Чем суперсистема отличается от систем механистического типа?
4. Какими основными критериями характеризуется суперсистема?
5. В чем заключается основной принцип самоорганизации суперсистем?
6. Каким образом постоянно модернизируется реальная суперсистема? Какой пример можно привести?
7. Каковы наиболее вероятные причины нарушения иммунного статуса у лиц, пострадавших в результате аварии на ЧАЭС?

10.3. Риск возникновения онкологического заболевания в зависимости от особенностей воздействия ионизирующего излучения

Ионизирующие излучения разных типов (например, рентгеновские лучи, β-излучение, α-частицы) различается по эффективности своего воздействия в отношении индукции рака. Кроме того, воздействие ИИ может быть внутренним вследствие заглатывания или вдыхания радиоактивных материалов или внешним от таких источников облучения, как, например, диагностическое рентгеновское обследование. Распространение радиоактивных материалов в организме человека, попавших в тело извне, представляет собой сложный процесс, и хотя оценки доз, полученных тканями и органами в результате такого пути поступления, и их влияния на состояние здоровья представляют собой достаточно сложную задачу, к настоящему времени были разработаны соответствующие модели, позволяющие провести такие оценки с достаточно высокой степенью точности.

После аварии на ЧАЭС одним из основных компонентов общего радиационного облучения стало именно внутреннее воздействие. Оценки рисков при внутреннем воздействии также были получены в ходе эпидемиологических обследований работников ядерного комплекса «Маяк» в России и нескольких других групп лиц, подвергшихся воздействию ИИ в разных странах.

На основании накопленных данных МКРЗ была сформулирована и проанализирована база данных о причинах, дифференцирующих наследственную и средовую предрасположенность некоторых людей к тем или иным видам раковых заболеваний по сравнению со среднестатистическими показателями. Есть определенные данные эпидемиологических исследований, основанные на изучении пациентов, проходивших курс радиотерапии, которые свидетельствуют о том, что люди с повышенной наследственной предрасположенностью подвергаются большему риску возникновения раковых заболеваний после облучения.

Результаты экспериментальных исследований с клеточными линиями *in vitro* и экспериментальными животными только подкрепили этот вывод и позволяют обосновать положение о том, что такая повышенная восприимчивость к ИИ у людей, предрасположенных к раковым заболеваниям, может иметь более распространенный характер, чем предполагалось ранее. Повышению индивидуальной восприимчивости к облучению могут способствовать и другие индивидуальные особенности (например, возраст, состояние гормональной и общей иммунной систем), а также некоторые экологические факторы (например, воздействие токсинов, пищевой рацион).

Однако в настоящее время этот предварительный вывод ограничивается лишь теми случаями, когда в семье явно проявляется повышенная предрасположенность к раковым заболеваниям. На основании эпидемиологических исследований для населения в целом это достаточно редкое явление, тем не менее более низкая степень наследственной предрасположенности к раковым заболеваниям, вызываемым воздействием ИИ, может иметь более общий характер.

В последние годы в этой области достигнут большой прогресс благодаря достижениям молекулярной генетики: активная разработка влияния ИИ на уровень мутагенеза в генах систем репарации, протоонкогенах и др., формирование феномена геномной нестабильности – все это позволяет по-новому взглянуть на проблему радиационно индуцированного рака.

Подводя итог изложенному, можно констатировать, что эпидемиологические исследования не дали четких подтверждений того, что передающаяся по наследству генетическая предрасположенность к раку, возникающая как следствие радиационного облучения, передается у людей в ряду поколений.

Самое крупное и наиболее обширное изучение этой проблемы было проведено с использованием данных о детях и внуках лиц, переживших атомные бомбардировки в Японии. В результате анализа авторы констатировали отсутствие увеличения частотности онкологических заболеваний в последующих поколениях.

Таким образом, эти исследования не позволяют сделать прямую оценку каких-либо наследственных рисков, обусловленных воздействием ИИ. В то же время они не подтверждают и тот факт, что никакого риска передачи по наследству эффектов радиационного облучения нет, поскольку трудно выявить небольшое превышение заболеваемости в результате воздействия ИИ в сравнении с и без того достаточно высокой заболеваемостью в группах населения, не подвергшихся облучению (табл. 10.2).

Таблица 10.2. **Последствия ИИ для наследственности (по данным МКРЗ)**

Класс заболевания	Базовая частотность (на 1 млн человек)	Риск в первом поколении на единицу радиационной дозы с низким ЛПЭ* (на 1 млн человек, подвергшихся облучению в размере 1 Гр)
Доминантные (включая заболевания, связанные с рентгеновским облучением)	16 500	≈ 750–1500
Хромосомные	4000	–**
Хронические полифакториальные	650 000	≈ 250–1200
Аномалии развития	60 000	≈ 2000

*Виды радиации с низким линейным переносом энергии (низкий ЛПЭ) включают рентгеновское излучение, γ-излучение и β-частицы.

**Предположительно это частично подпадает под категорию рисков, связанных с аутосомными доминантными заболеваниями и заболеваниями, связанными с рентгеновским облучением, и частично – под категорию аномалий развития.

Тем не менее результаты этих исследовании являются полезными в том плане, что они позволяют установить верхнюю границу для оценки любого, связанного с воздействием ИИ, риска.

Однако несмотря на отсутствие доказательства генетических исследованных эффектов ИИ у человека, прекращать такого рода попытки нельзя. В пользу этого свидетельствует ряд фактов. Например, у потомков лиц, переживших атомную бомбардировку, в первом поколении отмечается статистически достоверное уменьшение размера черепа (антропологическая (не медицинская) микроцефалия). Учитывая тот факт, что этот морфологический признак имеет полигенную природу, исключить мутагенную основу этого явления не представляется возможным.

Контрольные вопросы

1. Почему ИИ разных типов различается по эффективности своего воздействия в отношении индукции раковых заболеваний?
2. Какими путями может происходить облучение человеческого организма?
3. В чем заключаются особенности облучения организма человека после техногенных радиационных аварий?
4. Какие индивидуальные особенности человека способствуют повышению восприимчивости к облучению?
5. К каким результатам привели исследования различных поколений лиц, переживших атомные бомбардировки в Японии?

6. Какие дозы ИИ (согласно данным МКРЗ) и при какой базовой частотности вызывают такие заболевания, как аномалии развития и хронические полифакториальные заболевания?

10.4. Онкопатология, индуцированная воздействием ионизирующих излучений

Рак – наиболее серьезное последствие из всех последствий облучения для человека даже в диапозоне малых дозах. Обширные обследования, охватившие около 100 000 человек, переживших атомные бомбардировки Хиросимы и Нагасаки в 1945 г., показали, что, по-видимому, именно онкопатология является основной причиной роста смертности в этой группе населения.

На графике (рис. 10.3), построенном по результатам обследования людей, переживших атомную бомбардировку, отражен ориентировочный временной период появления злокачественных опухолей с момента облучения. Из данных графика следует, что после двухлетнего латентного периода прежде всего развиваются лейкозы, достигая максимальной частоты через 6–7 лет после облучения; затем их частота плавно уменьшается и через 25 лет становится практически равной нулю. Солидные опухоли начинают проявляться через приблизительно 10 лет после облучения, но, учитывая прошедший временной период, исследователи еще пока не располагают достаточной информацией, позволяющей построить полную кривую доза – эффект.

Оценки НКДАР в отношении риска заболевания раком для пострадавших лиц также в значительной мере опираются на результаты обследования людей, переживших атомную бомбардировку. НКДАР использует и другие материалы, в том числе сведения о частоте заболевания раком среди жителей островов в Тихом океане, на которых произошло выпадение радиоактивных осадков после ядерных испытаний в 1954 г.; среди рабочих урановых рудников; среди лиц, прошедших курс лучевой терапии. Но материалы по Хиросиме и Нагасаки – это единственный источник сведений, отражающий результаты тщательного обследования в течение более 30 лет многочисленной группы лиц всех возрастов и обоих полов, подвергшихся относительно более или менее равномерному облучению всего тела.

Несмотря на все эти исследования, приведенные выше оценки вероятности заболевания людей раком в результате облучения не вполне надежны. Необходимо также отметить, что к настоящему времени накоплена масса полезных сведений, полученных при экспериментах на животных, однако, несмотря на их очевидную значимость, они не могут в полной мере заменить сведений о действии ИИ на человека. Для того

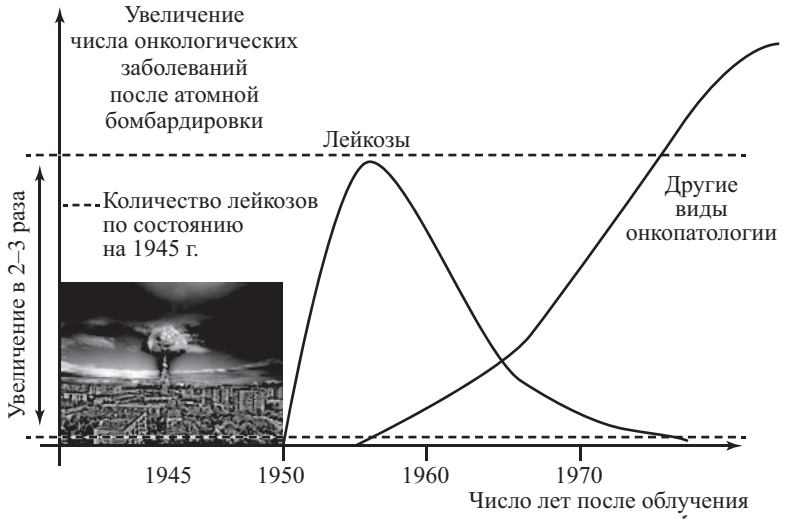

Рис. 10.3. Вероятность заболевания раком при радиационном облучении

чтобы оценка риска заболевания раком для человека была достаточно надежна, полученные в результате обследования человеческих популяций сведения должны удовлетворять целому ряду условий:

• должна быть известна достаточно точно величина поглощенной дозы;

• излучение должно равномерно попадать на все тело либо по крайней мере на ту его часть, локализация опухолей в которой изучается в настоящий момент;

• облученное население должно проходить обследования регулярно в течение нескольких десятилетий, чтобы успели реализоваться все основные нозологии раковых заболеваний;

• диагностика должна быть достаточно качественной, позволяющей выявить все случаи раковых заболеваний;

• очень важно также иметь хорошую группу сравнения, сопоставимую по всем базовым параметрам (за исключением самого факта облучения) с группой лиц, за которой ведется наблюдение; это позволит не только выяснить частоту заболевания раком в отсутствие облучения, но и достоверно зафиксировать рост заболеваемости (если последний имеет место);

• обе эти популяции должны быть достаточно многочисленны, чтобы полученные данные были статистически достоверны (при этом необходимо помнить, что в зависимости от спонтанной частоты встречаемости той или иной формы онкологической патологии размер групп сравнения будет варьировать в достаточно широких пределах).

Ни один из имеющихся материалов исследований, имеющихся в распоряжении МКРЗ, не удовлетворяет полностью всем этим требованиям.

Еще более принципиальная неопределенность подобного рода данных заключается в том, что почти все данные о частоте онкологических заболеваний, возникших в результате облучения ИИ, получены при обследовании людей, получивших относительно большие дозы облучения – 1 Гр и более.

Имеется весьма немного сведений о последствиях облучения при дозах, связанных с некоторыми профессиями, и совсем отсутствуют прямые данные о действии облучения, получаемого населением Земли в повседневной жизни (с учетом варьирования естественного фона Земли). Поэтому в настоящее время нет никакой альтернативы такому способу оценки риска населения при малых дозах облучения, как экстраполяция оценок риска при больших и средних дозах (уже не вполне надежных) в область малых доз облучения. Вместе с тем хорошо известно, что столь прямолинейная экстраполяция может существенно исказить реальную картину, однако любая другая альтернатива на сегодняшний момент отсутствует.

Научный комитет (ООН) по действию атомной радиации, равно как и другие учреждения, занимающиеся исследованиями в этой области, в своих оценках опирается на два основных допущения, которые пока что вполне согласуются со всеми имеющимися данными.

Согласно первому допущению не существует никакой пороговой дозы, ниже которой отсутствует дополнительный риск заболевания раком. Любая сколь угодно малая доза увеличивает вероятность заболевания раком для человека, получившего эту дозу, и всякая дополнительная доза облучения еще более увеличивает эту вероятность. Эту концепцию разделяет также и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ).

Второе допущение заключается в том, что вероятность, или риск, заболевания возрастает прямо пропорционально дозе облучения: при удвоении дозы риск удваивается, при получении трехкратной дозы – утраивается и т.д. НКДАР полагает, что при таком допущении возможна переоценка риска в области малых доз, но вряд ли возможна его недооценка. На такой заведомо несовершенной, но удобной основе и строятся все приблизительные оценки риска заболевания различными формами рака при облучении.

Согласно имеющимся данным первыми в группе раковых заболеваний, поражающих население в результате облучения, стоят лейкозы. Они вызывают гибель людей в среднем через 10 лет с момента облучения – гораздо раньше, чем другие виды раковых заболеваний, солидные опухоли реализуются гораздо позже – через 20–25 лет и более.

Так, по имеющимся на сегодняшний день данным смертность от лейкозов среди тех, кто пережил атомные бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, стала резко снижаться после 1970 г. Таким образом, оценка смертности от лейкоза в результате облучения на текущий момент наиболее надежна по сравнению с аналогичными оценками для других форм раковых заболеваний. Согласно оценкам НКДАР от каждой дозы облучения в 1 Гр в среднем два человека из тысячи умрут от лейкозов. Иначе говоря, если кто-либо получит дозу 1 Гр при облучении всего тела, при котором в обязательном порядке страдают клетки красного костного мозга, то существует один шанс из 500, что этот человек умрет в дальнейшем от лейкоза.

По имеющимся на сегодня данным после лейкозов самыми распространенными формами рака, индуцированными действием ИИ, оказались рак молочной железы и рак щитовидной железы. По оценкам НКДАР примерно у 10 человек из 1000 облученных отмечается рак щитовидной железы, а у 10 женщин из 1000 – рак молочной железы (в расчете на каждый грэй индивидуальной поглощенной дозы).

Однако обе упомянутые формы рака в принципе излечимы, а смертность от рака щитовидной железы, учитывая постчернобыльский опыт, особенно низка. Поэтому лишь 5 женщин из 1000, по-видимому, могут умереть от рака молочной железы на каждый грэй облучения, и лишь 1 человек из 1000 облученных, по-видимому, имеет реальный риск гибели от рака щитовидной железы.

Рак легких тоже принадлежит к группе весьма распространенных форм раковых заболеваний, типичных для облученных групп населения. В добавление к приведенным выше данным по обследованию лиц, переживших атомные бомбардировки Хиросимы и Нагасаки, были получены дополнительные сведения о частоте заболевания раком легких среди шахтеров урановых рудников в Канаде, Чехословакии, США и России. Любопытно, что оценки, полученные в обоих случаях, значительно расходятся: даже если принять во внимание разный характер облучения, вероятность заболеть раком легких на каждую единицу дозы облучения для шахтеров урановых рудников оказалась в 4–7 раз выше, чем для людей, переживших атомную бомбардировку. НКДАР рассмотрел несколько возможных причин такого расхождения, среди которых, по-видимому, не последнюю роль играет тот факт, что шахтеры в среднем старше, чем население японских городов на момент облучения. Согласно текущим оценкам НКДАР из группы людей в 1000 человек, возраст которых на момент облучения превышает 35 лет, вполне вероятно, что 5 человек умрут от рака легких в расчете на каждый грэй средней индивидуальной дозы облучения.

Рак других органов и тканей, как оказалось, встречается среди облученных групп населения гораздо реже. Согласно оценкам НКДАР вероятность умереть от рака желудка, печени или толстой кишки составляет примерно всего лишь 1/1000 на каждый грэй средней индивидуальной дозы облучения, а риск возникновения рака костных тканей, пищевода, тонкой кишки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, прямой кишки и лимфатических тканей еще меньше и составляет примерно от 0,2 до 0,5 случаев на каждую 1000 облученных и на каждый грэй средней индивидуальной дозы облучения.

Дети более чувствительны к действию ИИ, чем взрослые, а при облучении плода риск заболевания любой формой рака, по-видимому, еще больше. В некоторых работах действительно сообщалось, что детская смертность от рака существенно выше среди тех детей, матери которых в период беременности подверглись воздействию рентгеновского излучения.

Однако в распоряжении научной общественности имеется ряд данных, свидетельствующий о наличии расхождений между данными по Японии и другими источниками: например, имеются значительные расхождения по распространенности рака у пострадавшего населения как по раку молочной железы, так и по раку щитовидной железы. И в том, и в другом случае данные по Японии дают значительно более низкую частоту заболевания раком, чем другие источники; в обоих случаях НКДАР принял в качестве оценок бóльшие значения. Указанные противоречия лишний раз подчеркивают трудности получения реальных оценок онкогенных эффектов в области малых доз на основании экстраполяции сведений, относящихся к большим дозам и полученных из весьма ограниченного числа источников. Трудность получения более или менее надежных оценок риска еще более возрастает из-за неопределенности в оценке доз, которые были получены людьми, пережившими атомную бомбардировку. Новые сведения из других источников фактически поставили под сомнение правильность прежних расчетов поглощенных доз в Японии, и все они в настоящее время проверяются заново.

Поскольку получение реальных оценок связано с большими трудностями, то неудивительно, что нет единого мнения по вопросу о том, насколько велик риск заболевания раком при малых дозах ИИ. В этой области необходимы дальнейшие исследования. Особенно полезно было бы провести обследование людей, получающих дополнительные дозовые нагрузки вследствие профессиональной деятельности и (или) специфических условий окружающей среды.

К сожалению, чем меньше доза, тем труднее получить статистически достоверный результат. Подсчитано, например, что если оценки НКДАР более или менее верны, то при определении частот заболеваемости

по всем видам рака среди персонала предприятий ядерного топливного цикла, получающих среднюю индивидуальную дозу около 10 мГр в год, для получения значимого результата потребуется несколько миллионов человеко-лет. А получить значимый результат при обследовании людей, на которых действует лишь радиационный фон от окружающей среды, будет гораздо труднее.

Есть ряд вопросов еще более сложных, но настоятельно требующих своего изучения. ИИ, например, может, в принципе, оказывать действие на разные химические и биологические агенты, модифицируя их характеристики, что может приводить в каких-то случаях к дополнительному увеличению частоты заболевания раком.

Давно высказывались предположения о том, что ИИ, возможно, ускоряет процессы старения и таким образом уменьшает продолжительность жизни. НКДАР рассмотрел недавно все данные в пользу такой гипотезы, но не обнаружил достаточно убедительных доказательств, подтверждающих ее, как для человека, так и для животных, по крайней мере при умеренных и малых дозах, получаемых при хроническом облучении. Облученные группы людей действительно имеют меньшую продолжительность жизни, но во всех известных случаях это целиком объясняется большей частотой онкологических заболеваний.

Контрольные вопросы

1. Какие выводы следуют из графика, представленного на рис. 10.3?
2. В чем заключается научная ценность материалов, полученных по результатам обследования лиц, пострадавших от атомной бомбардировки?
3. Каким условиям должны удовлетворять сведения, полученные в результате обследования человеческих популяций, для того чтобы оценка риска заболевания раком для человека была достаточно надежна?
4. На какие допущения опирается НКДАР в своих оценках риска облучения населения ИИ?
5. Какие заболевания, поражающие население в результате радиационного облучения, стоят первыми в группе раковых заболеваний? Почему?
6. Какие раковые заболевания могут возникнуть у населения в расчете на каждый грэй индивидуальной поглощенной дозы? Какова предполагаемая смертность от этих заболеваний?
7. В чем причина расхождения данных о частоте заболевания раком легких среди шахтеров урановых рудников в Канаде, Чехословакии, США, России и лиц, переживших атомные бомбардировки Хиросимы и Нагасаки?
8. Почему в настоящее время проверяются заново прежние расчеты поглощенных доз в Японии?
9. Насколько правомерна гипотеза о том, что ИИ ускоряет процессы старения и уменьшает продолжительность жизни?

ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ

BER (от англ. Base Excision Repair) – эксцизионная репарация оснований ДНК.

CDK (от англ. Cyclyn-depnded-kinase) – циклин-зависимые киназы, обеспечивающие прохождение клетки по клеточному циклу. При повреждении ДНК инактивируются, тем самым обеспечивая функционирование контрольных точек.

D_0 – доза, в среднем соответствующая одному попаданию в мишень и снижающая число выживших клеток в *e* раз. Для большинства делящихся клеток D_0 = (1,2–2,0) Гр.

FISH (от англ. Flourescence In Situ Hibridization) – метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (от лат. – на месте). Флуоресцирующие красители связываются с определенными участками генома, позволяя тем самым идентифицировать повреждения хромосом.

HR (от англ. Homologous Recombination) – способ репарации двунитиевых разрывов ДНК с участием фрагмента неповрежденной гомологичной ДНК, обычно от сестринской хроматиды.

LD_{50} (доза полулетальная, ЛД50) – величина дозы, вызывающая 50%-ную гибель облучаемых объектов.

MiRNA (микроРНК) – небольшие (19–22 нуклеотидов) однонитиевые некодирующие РНК, которые экспрессируются в клетках и способны регулировать экспрессию генов за счет взаимодействия с мРНК.

MMK (от англ. Mismatch Repair) – система репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, появляющихся вследствие ошибочной работы ДНК-полимераз.

SOS-репарация – система, которая включается тогда, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что это угрожает жизни клетки. В этом случае происходит индукция разных генов, задействованных в различных клеточных процессах, сопряженных с репарацией ДНК. Включение тех или иных генов, определяемых количеством повреждений в ДНК, приводит к разным по значимости клеточным ответам (начиная со стандартной репарации поврежденных нуклеотидов и заканчивая подавлением клеточного деления).

Активность (A) – мера радиоактивности какого-либо количества радионуклида, находящегося в данный момент времени в определенном энергетическом состоянии. Единица активности – беккерель (Бк).

Альфа-излучение (α-излучение) – поток α-частиц.

Альфа-частица (α-частица) – частица с зарядом, равным двум положительным элементарным единицам. Представляет собой ядро атома гелия, которое состоит из двух протонов и двух нейтронов.

Амбиентный эквивалент дозы (амбиентная доза) H*(d) – эквивалент дозы, который используется для характеристики поля излучения в точке, совпадающей с центром шарового фантома МКРЕ на глубине d (в миллиметрах) от поверхности по диаметру, параллельному направлению излучения, если бы такой

фантом был помещен в расширенное и выровненное поле излучения, идентичное рассматриваемому по составу, флюенсу и энергетическому распределению. Эта величина применительно к реальному полю характеризует консервативную оценку дозы облучения человека. Единица измерения эквивалента амбиентной дозы – зиверт (Зв).

Анафаза – третья фаза митоза (непрямого деления клетки).

Анионы – ионы с отрицательным зарядом.

Аплазия – врожденное отсутствие органа или части тела.

Апоптоз – запрограммированный процесс уничтожения клетки, вызванный внутренними (внутриклеточными) или внешними (внеклеточными) как физиологическими, так и патологическими факторами, активирующими генетическую программу гибели клетки и ее удаление из ткани.

Атомный коэффициент поглощения (μ_a) – величина, равная доле энергии, поглощаемой на один атом поглотителя и учитывающая действительное число атомов в поглощающем материале.

Атомный номер – число протонов в ядре атома.

Атом – химически не делимая электронейтральная частица, состоящая из положительно заряженного ядра и отрицательно заряженных электронов.

Базовые физические величины – величины, являющиеся мерой воздействия ионизирующего излучения на вещество. Базовыми физическим величинами являются: активность нуклидов, флюенс частиц, плотность потока частиц, поглощенная доза, керма, величина линейной передачи энергии.

Беккерель (Бк) – единица СИ активности радиоактивных изотопов. В источнике с активностью 1 Бк в среднем происходит одно спонтанное ядерное превращение в секунду (1 Бк = 1 распад/с). Использовавшаяся ранее внесистемная единица активности кюри (Ки) составляет $3{,}7 \cdot 10^{10}$ Бк.

Бергонье – Трибондо правило (закон) – радиочувствительность клеток прямо пропорциональна их пролиферативной активности и обратно пропорциональна степени дифференцировки составляющих ее клеток.

Бета-излучение (β-излучение) – поток β-частиц.

Бета-частица (β-частица) – заряженая частица (отрицательно – электрон (β^-), положительно–позитрон (β^+)), испускаемая в результате β-распада.

Брэгга кривая – кривая изменения удельной потери энергии частицы вдоль ее пробега в веществе. Для α-частицы и ионов эта кривая имеет ярко выраженный пик, который получил название пика Брэгга.

Взвешивающий коэффициент излучения (W_R) – коэффициент, используемый в определении нормируемой величины эквивалентной дозы облучения органа или ткани. Для фотонов (рентгеновского излучения и γ-излучения) $W_R = 1$, для других излучений $W_R \geq 1$. Являясь обобщением большого объема экспериментальных данных, значения W_R характеризуют вероятность возникновения некоторого стандартного стохастического эффекта при воздействии излучений различной природы на стандартного человека в условиях хронического облучения в области малых доз.

Гамма-излучение (γ-излучение) – электромагнитное излучение, возникающее в процессе радиоактивного распада. Представляет собой коротковолновый ($< 10^{-10}$ м) фотон с высокой энергией.

Горячие частицы – частицы размером в несколько микрометров или меньше, образующиеся в результате радиоактивных выпадений. Активность горячих частиц на несколько порядков превышает активность основной части выпавших радионуклидов.

Грэй (Гр) – единица поглощенной дозы ионизирующего излучения в Международной системе единиц (СИ), которая соответствует 1 Дж/кг.

Делеция – утрата участка хромосомы. Различают терминальные и интеркалярные делеции. Терминальные делеции связаны с утратой концевого участка хромосомы, а интеркалярные – с утратой на внутреннем участке хромосомы.

Дицентрические хромосомы (дицентрики) – редкий тип аномальной хромосомы, когда два хромосомных сегмента из разных хромосом или из двух хроматид одной хромосомы соединяются конец в конец с потерей ацентрических фрагментов.

Дупликация – повторение участка хромосомы. Дупликации представляют собой класс перестроек, который объединяет как внутри-, так и межхромосомные перестройки.

Естественная радиация – радиация окружающей среды, обусловленная излучением природных радиоактивных элементов и космическими лучами.

Зиверт (Зв) – единица СИ эквивалентной и эффективной доз облучения.

Изотопы – нуклиды конкретного химического элемента, которые имеют в ядре одинаковое число протонов, но разное число нейтронов, вследствие чего имеют одинаковый заряд, но различную атомную массу, например -протий, -дейтерий, -тритий.

Изохромосомы – копии одного плеча хромосомы, соединенные центромерой таким образом, что плечи образовавшейся хромосомы представляют собой зеркальные отражения друг друга. В определенном смысле изохромосома представляет собой гигантскую инвертированную дупликацию размером с целое плечо и делецию другого плеча.

Инверсия – изменение порядка генов участка хромосомы на обратный, т.е. поворот участка хромосомы на 180°. Различают парацентрические и перицентрические инверсии. При парацентрических инверсиях инвертированный фрагмент лежит по одну сторону от центромеры, а при перицентрических инверсиях – по разные стороны от центромеры.

Индивидуальный эквивалент дозы ($H_p(d)$) – эквивалент дозы в мягкой биологической ткани, определяемый на глубине d (в миллиметрах) под рассматриваемой точкой на поверхности плоского фантома или на теле взрослого человека. Единицей индивидального эквивалента дозы является зиверт (Зв).

Интерфаза – состояние растительной или животной клетки между двумя митозами.

Интерфазная гибель клеток – гибель облученных клеток вскоре после облучения. Для всех делящихся и большинства неделящихся клеток интерфазная гибель наступает лишь при дозах в сотни грэй (Гр). Исключение составляют

лимфоциты и половые клетки на некоторых стадиях их развития; они гибнут интерфазно уже при дозах в несколько десятков грэй.

Ионизация – процесс приобретения или потери электрона нейтральным атомом или молекулой, в результате которого они превращаются в анионы или катионы.

Ионизирующее излучение – излучение, которое приводит к образованию ионов.

Ионы – заряженные частицы, представляющие атом или группу связанных атомов с положительным или отрицательным зарядом.

Катион – ион с положительным зарядом.

Керма (К) – отношение суммы начальных кинетических энергий $d\varepsilon_к$ всех заряженных ионизирующих частиц, образовавшихся под действием косвенно ионизирующего излучения в элементарном объеме вещества, к массе *dm* вещества в этом объеме. Единица измерения кермы – грэй (Гр).

Клеточный (митотический) цикл – период жизни клетки от одного деления до другого. Клеточный цикл условно подразделяют на две фазы – интерфазу, во время которой клетка растет и готовится к воспроизводству, и митоз, во время которого ядро, а затем остальная часть клетки делятся. Отсюда название двух типов радиационно-обусловленной клеточной гибели – интерфазная и митотическая (репродуктивная).

Коллективная эффективная доза (S) – специальная дозиметрическая величина, предназначенная для оценки коллективного радиологического ущерба в области облучения малых доз. Коллективная эффективная доза является инструментом для оценки ожидаемого ущерба при облучении больших групп людей. Единица измерения коллективной эффективной дозы – человеко-зиверт (чел.-Зв).

Кольцевая хромосома – замкнутая двухцепочечная молекула ДНК, естественная структура хромосом у многих прокариот, некоторых вирусов, а также молекул ДНК, входящих в состав пластид и митохондрий эукариот. У некоторых вирусов кольцевая хромосома состоит из одноцепочечной молекулы ДНК или РНК.

Коэффициент относительной биологической эффективности ($К_{ОБЭ}$) – отношение дозы данного и стандартного излучений, обладающих равным биологическим эффектом при прочих равных условиях облучения. В качестве стандартного выбирают рентгеновское излучение с энергией квантов 200 кэВ, которое образует примерно 100 пар ионов на 1 мкм пути в воде. Для такого излучения ОБЭ-коэффициент принимают равным единице.

Ко́мптон-эффект (эффект Ко́мптона) – процесс взаимодействия между фотоном γ-кванта или коротковолнового рентгеновского излучения и свободным, или слабо связанным орбитальным электроном атома поглощающего вещества. Падающий фотон выбивает орбитальный электрон атома вещества. Часть его энергии поглощается, а часть передается в виде кинетической энергии электрону отдачи.

Линейная передача энергии (ЛПЭ) – величина потери энергии на единицу пробега, которая обратно пропорциональна кинетической энергии частицы и связана с плотностью распределения событий ионизации вдоль трека частицы.

За единицу измерения ЛПЭ принимают 1 кэВ/мкм ткани (1 кэВ/мкм = = 62 Дж/м).

Линейная плотность ионизации (ЛПИ) – количественная мера ионизирующей способности ионизирующего излучения и равняется числу пар ионов, создаваемых частицей (квантом) на единице пути в веществе. ЛПИ = ЛПЭ/34.

Линейный коэффициент поглощения ($\mu_л$) – величина, характеризующая способность вещества поглощать падающее на него излучение. Поглощения γ-излучения происходит по экспоненциальному закону (чем толще поглотитель, тем больше будет поглощение), поэтому этот вид излучения не имеет строго определенного пробега. Рассчитывается обычно на сантиметр (1/см).

Массовый коэффициент поглощения ($\mu_м$) – величина, равная линейному коэффициенту поглощения, деленному на плотность поглотителя. Преимущество этой величины в том, что она не зависит от природы поглотителя.

Метафаза – вторая фаза клеточного цикла.

Митоз – непрямое деление клетки, обеспечивающее образование генетически идентичных дочерних клеток.

Мощность амбиентного эквивалента дозы (МАЭД) (мощность амбиентной дозы) H*(d) – отношение приращения амбиентного эквивалента дозы H*(d) за интервал времени *dt* к величине этого интервала. Единицы измерения МАЭД – Зв/ч, мЗв/ч, мкЗв/ч.

Мутагенез – процесс возникновения мутаций.

Мутация – внезапное и резкое изменение какого-либо признака.

Некроз – омертвение клеток и тканей в живом организме, сопровождающееся необратимым прекращением их функций.

Неупругое взаимодействие – процесс, при котором часть кинетической энергии частиц расходуется на ионизацию и возбуждение атомов, возбуждение и расщепление ядер или тормозное излучение. При этом суммарная кинетическая энергия частиц до взаимодействия будет равнай суммарной кинетической энергии частиц после взаимодействия плюс энергия, затраченная на ионизацию и возбуждение атомов, возбуждение и расщепление ядер или тормозное излучение.

Нормируемые дозиметрические величины – величины, которые характеризуют облучение человека, т.е. воздействие на него ионизирующего излучения. Их определение служит задачам обеспечения радиационной безопасности человека. К нормируемым величинам относятся эквивалентная доза, эффективная доза, коллективная эффективная доза.

Ожидаемая эквивалентная доза внутреннего облучения органа или ткани HT(τ) – временной интеграл мощности эквивалентной дозы в органе или ткани, которая формируется в течение некоторого времени τ после поступления радиоактивного вещества в организм стандартного человека. Единица измерения ожидаемой эквивалентной дозы – зиверт (Зв).

Операционные величины – величины, являющиеся непосредственно определяемыми в измерениях величинами, предназначенными для оценки нормируемых величин при радиационном контроле. К операционным величинам относятся индивидуальный эквивалент дозы, амбиентный эквивалент дозы и амбиентная доза.

Относительная биологическая эффективность (ОБЭ) – относительная по сравнению с рентгеновским излучением его способность при равной поглощенной дозе вызывать лучевое поражение определенной выраженности (степени). В основном определяется ЛПЭ и связана с ней определенной зависимостью.

Период полураспада – время, за которое распадается половина ядер какого-либо радиоизотопа.

Пикноз ядра клетки – процесс уплотнения и сморщивания ядра клетки.

Плотность потока частиц (φ) – флюенс за единицу времени. Единица измерения плотности потока частиц или квантов – част/(см^2·с).

Поглощенная доза излучения (D) – основная дозиметрическая величина, которая является мерой энергии, переданной ионизирующим излучением веществу. Единица измерения поглощенной дозы – грэй (Гр), 1 Гр = 1 Дж/кг.

Пролиферация – разрастание ткани растительного или животного организма путем новообразования клеток.

Профаза – первая стадия митоза.

Радиационно-индуцированная генетическая нестабильность – общее повышение уровня мутаций, дестабилизация хромосом, гибель клеток и высокий риск опухолевой трансформации. Индуцировать состояние нестабильности может как редко-, так и плотноионизирующее излучение, т.е. этот феномен с биологической точки зрения является достаточно универсальным.

Радиационный гормезис – повышение плодовитости, роста, деления клеток и увеличение продолжительности жизни различных биологических объектов при воздействии на них малых доз тонизирующих излучений.

Радиация – в узком значении ионизирующее излучение, т.е. вид энергии образующей ионы.

Радиоадаптация – приспособление к радиационной нагрузке, которое делает возможным сохранение жизнеспособности, поддержание фертильности и нормальной функциональной стабильности всех структур биологического объекта в условиях дальнейшего воздействия ионизирующих излучений.

Радиоактивность – испускание ядрами неустойчивых атомов элементарных частиц, других ядер или электромагнитного излучения.

Радиоактивный распад – превращение радионуклида в более устойчивый нуклид, сопровождающееся радиоактивным излучением.

Радиобиология (радиационная биология) – наука, которая изучает воздействие ионизирующих и неионизирующих излучений на биологические системы.

Радиорезистентность – устойчивость биологических объектов к действию ионизирующей радиации. К радиорезистентным в организме человека относятся мышечная, нервная, костная ткани.

Радиочувствительность – величина, обратная отношению величин доз ионизирующего излучения, вызывающих количественно равные эффекты одного типа в сравниваемых биологических системах. Другими словами, это мера чувствительности биологического объекта к действию ионизирующей радиации. К радиочувствительным в организме человека относятся кроветворная система и эпителий слизистой оболочки тонкого кишечника.

Репродуктивная гибель клеток – нарушение способности делящихся клеток к неограниченному воспроизводству: после одного-двух делений дефектные потомки клеток отмирают.

Стохастический – вероятностный, относящийся к случайным переменным.

Телофаза – последняя фаза митоза.

Тканевый весовой множитель (W_T) – безразмерный множитель ($W_T < 1$), на который умножается накопленная в тканях и органах эквивалентная доза, для того чтобы рассчитать эффективную дозу для всего организма.

Толщина слоя полупоглощения – величина, которая определяется как толщина слоя материала поглотителя, который снижает интенсивность падающего излучения вдвое.

Транскрипционный фактор – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, p53 (белок p53) выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей. Свое название белок получил по молекулярной массе – 53 кДа. Реальная молекулярная масса белка составляет 43,7 кДа. Погрешность в первоначальном определении молекулярной массы вызвана наличием множества остатков пролина в составе p53, которые замедляют движение белка в геле.

Транслокация – межхромосомная перестройка, при которой происходит перенос участка одной хромосомы на другую. Отдельно выделяют реципрокные транслокации и робертсоновские транслокации, или центрические слияния. При реципрокных транслокациях две негомологичные хромосомы обмениваются участками, а при робертсоновских транслокациях две негомологичные акроцентрические хромосомы объединяются в одну с утратой материала коротких плеч.

Трансурановые элементы – элементы с атомным номером большим, чем у урана. Одиннадцать трансурановых элементов (93–103) принадлежат к числу актиноидов.

Удельная ионизация – число пар ионов, образуемых на единицу пути (в сантиметрах) по следу ионизирующей частицы в воздухе при нормальном давлении, т.е. интенсивность ионизации.

Ультрофиолетовое излучение – электромагнитное излучение с длиной волны менее 400 нм.

Упругое взаимодействие – процесс взаимодействия частиц, при котором суммарная кинетическая энергия частиц до взаимодействия равна суммарной кинетической энергии после их взаимодействия. Следствие этого взаимодействия – лишь изменение направления движения частиц.

Флюенс частиц (Ф) – отношение числа частиц dN, проникающих в элементарную сферу, к площади центрального сечения dS этой сферы. Единица измерения флюенса частиц (квантов) – част/см^2.

Фотон – электромагнитная частица с волновыми свойствами и определенным уровнем энергии.

Фотоэлектрический эффект – процесс, при котором энергия падающего кванта полностью поглощается веществом и в результате появляется свободный электрон, обладающий определенной кинетической энергией. Свободный электрон, ассоциируясь с одним из нейтральных атомов, порождает отрицательный ион.

Хейфлика предел – максимальное число делений для каждого типа соматических клеток.

Хромосомные аберрации (хромосомные перестройки, хромосомные мутации) – тип мутаций, которые изменяют структуру хромосом. Изменение структуры хромосом связано с ее разрывом, последующим перераспределением, утратой или частичным удвоением генетического материала.

Цитокинез (цитотомия) – деление тела эукариотической клетки. У растительной клетки происходит путем внутриклеточного образования клеточной перегородки, а у клеток животных – путем перетяжки, впячивания плазматической мембраны внутрь клетки.

Человеко-зиверт (чел.-Зв) – единица коллективной эффективной дозы.

Эквивалентная доза облучения (H_T) органа или ткани – величина, равная поглощенной дозе в органе или ткани, умноженной на соответствующий взвешивающий коэффициент излучения W_R. Единица измерения эквивалентной дозы – зиверт (Зв).

Электромагнитное излучение (ЭМИ) – спектр частиц с волновой функцией и с определенным уровнем энергии, зависимым от длины волны. ЭМИ подразделяется на видимый свет, инфракрасное излучение, радиоволны, ультрафиолетовое излучение, рентгеновское излучение, γ-излучение.

Электрон-позитронных пар образование – процесс взаимодействия γ-кванта с каким-либо атомным ядром, в поле которого и образуется электронно-позитронная пара. Вероятность такого процесса пропорциональна Z^2, поэтому для тяжелых элементов она больше, чем для легких.

Электронный коэффициент поглощения ($\mu_э$) – доля излучения, поглощенная на электрон поглотителя. Применяется для γ-квантов низкой энергии, которые взаимодействуют преимущественно с орбитальными электронами.

Эффективная доза (E) – величина, приводящая все возможные случаи пространственно неоднородного (внешнего или внутреннего) облучения тканей и органов тела стандартного человека к эквивалентному по ущербу равномерному облучению всего тела. Единица измерения эффективной дозы – зиверт (Зв).

Эффект «свидетеля» (немишенный эффект, bystander effect) – появление мутаций, хромосомных аберраций и изменений в экспрессии генов в клетках, которые сами не подвергались прямому радиационному воздействию. Данные клетки восприняли радиационный сигнал от облученных клеток и являются «свидетелями» радиационных событий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Абрамова, *Ж.И.* Человек и противоокислительные средства / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер. М.: Наука, 1985. 230 с.

Амирагова, *М.И.* Первичные радиобиологические процессы / М.И. Амирагова [и др.]; под ред. Н.В. Тимофеева-Ресовского. М.: Атомиздат, 1973. 336 с.

Бак, *З.* Основы радиобиологии / З. Бак, П. Александео; пер. с англ. М.: Издательство иностранной литературы, 1963. 500 с.

Бонд, *В.* Радиационная гибель млекопитающих. Нарушение кинетики клеточных популяций / В. Бонд, Т. Флиднер, Д. Аршамбо; пер с англ. М.: Атомиздат, 1971. 326 с.

Бурлакова, *Е.Б.* Роль липидов в регуляции клеточного метаболизма мембранами и ее нарушение под действием облучения / Е.Б. Бурлакова // Влияние радиации на регуляторные процессы в клетке: тезисы доклада Всесоюзного симпозиума (Пущино, 25–28 мая 1976 г.). Пущино: Научный центр биологических исследований; АН, 1976. С. 22–23.

Бурлакова, *Е.Б.* Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома / Е.Б. Бурлакова, В.Ф. Михайлов, В.К. Мазурик // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 489–499.

Гомеостаз / под ред. П.Д. Горизонтова. М.: Медицина, 1976. 416 с.

Груздев, *Г.П.* Проблема поражения кроветворной ткани при острой лучевой патологии / Г.П. Груздев. М.: Медицина, 1968. 124 с.

Гуськова, *А.К.* Лучевая болезнь человека / А.К. Гуськова, Т.Д. Байсоголов. М.: Медицина, 1971. С. 55.

Данилевская, *О.Н.* Молекулярная организация структурных элементов хромосом / О.Н. Данилевская, И.П. Арман // Организация генома. М.: Наука, 1989. С. 89–109.

Заварин, *А.А.* Основы общей цитологии / А.А. Заварин. Л.: Издательство Леиинградского университета, 1982. 240 с.

Иванов, *И.И.* Биоэнергетика в тканях и клетках при остром лучевом поражении / И.И. Иванов // Проблемы энергетики в облученном организме (Современные проблемы радиобиологии). М.: Атомиздат, 1977. Т. VI. С. 196–201.

Ичас, *М.* Биологический код / М. Ичас; пер. с англ. М.: Мир, 1971. 351 с.

Клемпарская, *Н.И.* Неспецифические приобретенные иммунодефициты (вопросы диагностики, профилактики и лечения) / Н.И. Клемпарская, Г.А. Шальнова. М.: Минздрав СССР, 1989. 189 с.

Коломийцева, И.К. Радиационные нарушения метаболизма липидов мембранных образований клетки / И.К. Коломийцева, А.В. Васильев // Радиационная биохимия (Современные проблемы радиобиологии). М.: Атомиздат, 1975. Т. IV. С. 149–163.

Коноплянников, *А.Г.* Радиобиология стволовых клеток / А.Г. Коноплянников. М.: Энергоатомиэдат, 1984. 120 с.

Крамеров, *Д.А.* Организация генома и единиц транскрипции у высших организмов / Д.А. Крамеров // Биологическая химия (Итоги науки и техники). М.: ВИНИТИ, 1981. Т. 16. С. 4–56.

Кудряшов, *Ю.Б.* Основы радиационной биофизики / Ю.Б. Кудряшов, Б.С. Баренфельд. М: Издательство Московского университета, 1982. 304 с.

Кузин, *А.М.* Радиационная биохимия / А.М. Кузин. М.: Издательство АН СССР, 1962. 355 с.

Лихтенштейн, *А.В.* Опухолевый рост: ткани, клетки, молекулы / А.В. Лихтенштейн, В.С. Шапот // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1998. № 3. С. 25–44.

Мазурик, *В.К.* Биологические системы репарации ДНК / В.К. Мазурик // Общая генетика (Итоги науки и техники). Биологические системы репарации ДНК у эукариотов. М.: ВИНИТИ, 1978. Т. 4. С. 58–104.

Мазурик, *В.К.* Влияние потенциального противолучевого средства – соединения НС-1539 на репаративный синтез ДНК, индуцируемый повреждающим действием химического мутагена М-нитрозо-М-метилмочевины и излучений // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. Вып. 4. С. 526–533.

Мазурик, *В.К.* Механизмы пострадиационного нарушения биосинтеза ДНК. Разделение, частичная очистка, характеристика и изменения активности ДНК-полимераз a и b костного мозга у крыс в ранние сроки после облучения; сопоставление с состоянием репарационного и репликационного синтеза ДНК // В.К. Мазурик, Л.Н. Ушенкова. Радиобиология. 1985. Т. 25. Вып. 4. С. 444–448.

Мазурик, *В.К.* Некоторые проблемы радиационной биохимии ДНК / В.К. Мазурик // Современные проблемы радиобиологии. Т. 4. Радиационная биохимия. М.: Атомиздат, 1975. С. 7–40.

Мазурик, *В.К.* О механизмах радиобиологических явлений в связи с регуляторной ролью гена и белка p53 // Патологическая физиология и эксперимент, терапия. 2003. Т. 43. № 1. С. 11–18.

Мазурик, *В.К.* О некоторых молекулярных механизмах основных радиобиологических последствий действия ионизирующих излучений на организм / В.К. Мазурик, В.Ф. Михайлов // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. Вып. 1. С. 91–98.

Мазурик, *В.К.* Проблемы радиобиологии и белок p53 / В.К. Мазурик, Б.Б. Мороз // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 535–559.

Манойлов, *С.Е.* Корреляция между радиочувствительностью и состоянием биоэнерегетики / С.Е. Манойлов // Проблемы энергетики в облученном организме (Современные проблемы радиобиологии). М.: Атомиздат, 1977. Т. VI. С. 128–153.

Михайлов, *В.Ф.* Сигнальная функция активных форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающие воздействия: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома / В.Ф. Михайлов, В.К. Мазурик, Е.Б. Бурлакова // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43. № 1. С. 5–18.

Мороз, *Б.В.* Радиобиологический эффект и эндокринные факторы / Б.В. Мороз, И.Н. Кендыш. М.: Атомиздат, 1975. 229 с.

Моссэ, *И.Б.* Генетические эффекты ионизирующей радиации / И.Б. Моссэ, П.М. Морозик. Минск: Беларуская навука, 2018. 299с.

Нефедов, *И.Ю.* Актуальные аспекты проблемы генетических последствий облучения млекопитающих (обзор литературы) / И.Ю. Нефедов, И.Ю. Нефедова, Г.Ф. Палыга // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. № 4. С. 358–372.

Окада, *Ш.* Радиационная биохимия клетки / Ш. Окада; пер. с англ. М.: Мир, 1974. 407 с.

Основы клинической радиобиологии /М.С. Джойнер, О.Дж. ван дер Когель; пер. с англ. М. Бином. 2020. 600 с.

Программированная клеточная гибель / gоd ред. В.С. Новикова. СПб.: Наука, 1996. 276 с.

Публикация № 27 МКРЗ. Проблемы, связанные с разработкой показателя вреда для воздействия ионизирующих излучений / пер. с англ. М.: Энергоатомиздат, 1987. С. 22.

Радиационая медицина = Radiation medicine: учеб. пособие для иностранных студентов / А.Н. Стожаров [и др.]; под ред. проф. А.Н. Стожарова. Минск: Новое знание, 2020. 205 с.

Радиобиология: вчера, сегодня, завтра: курс лекций / Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета; Гродненский государственный медицинский университет; И.Э. Бученков [и др.]. Минск: ИВЦ Минфина, 2018. 203 с.

Радиобиология: медико-экологические проблемы: монография / С.А. Маскевич [и др.]; под ред. проф. С.А. Маскевича; Международный государственный экологический институт им. А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета; Гродненский государственный медицинский университет. Минск: ИВЦ Минфина, 2019. 256 с.

Рудин, *Д.* Биогенез митохондрий / Д. Рудин, Д. Уилки; пер с англ. М.: Мир, 1970. 156 с.

Руководство по радиационной гематологии (совместное издание МАГАТЭ и ВОЗ) / пер. с англ. М.: Медицина, 1974. 242 с.

Саенко, *А.С.* О природе и репарации сублетальных повреждений / А.С. Саенко [и др.] // Радиобиология. 1981. Т. 21. Вып. 1. С. 26–44.

Сапежинский, *И.И.* Кинетика химической модификации радиационных превращений ДНК в многокомпонентных системах. Аналитический обзор / И.И. Сапеженский, Е.Л. Лозовская // Радиобиология 1992. Т. 32. Вып. 2. С. 172–179.

Страйер, *Л.* Биохимия: в 3 т. / Л. Стайер; пер. с англ. М.: Мир, 1985. Т. 3. 450 с.

Тутпочкина, *А.Т.* Гликопротеиды крови при лучевой болезни / А.Т. Тутпочкина, Т.А. Нестерова // Современные проблемы радиобиологии. Радиационная биохимия. М.: Атомиздат, 1975. Т. IV. С. 130–148.

Фогель, *Ф.* Генетика человека: в 3 т. / Ф. Фогель, А. Мотульски; пер. с англ. М.: Мир, 1990. Т. 2. С. 225.

Хансон, *К.П.* Генетическая гипотеза интерфазной гибели лимфоидных клеток / К.П. Хансон // Интерфазная гибель облученных клеток. Обнинск: НИИ медицинский радиологии. АМН СССР. 1979. С. 80–82.

Хансон, *К.П.* Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток / К.П. Хансон, В.Е. Комар. М.: Энергоатомиздат, 1985. С. 69–85.

Шарпатый, *В.А.* Радиационная химия биополимеров / В.А. Шарпатый. М.: Энергоиздат, 1981. 168 с.

Штреффер, *Г.* Радиационная биохимия / Г. Штреффер. М.: Атомиздат. 1972. 200 с.

Ярилин, *А.А.* Апоптоз: природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1998. № 2. С. 26–42.

Aldridge, *D.R.* Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines / D.R. Aldridge, J.R. Radford // Cancer Res. 1998. Vol. 58. № 13. P. 2817–2824.

Allen, *R.C.* Oxidative stress and gene regulation / R.C. Allen, M. Tresini // Free Radic. Bid. Med. 2000. Vol. 28, № 3. P. 463–499.

Arnold, *R.S.* Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Noxld. R.S. Arnold [et all.] // Proc. Nat. Acad. Sci. 2001. Vol. 98. № 10. P. 5550–5555.

Bellavile, *P.* The superoxide-fonning enzymatic system of phagocytes / P. Bellavile // Free Radic. Biol. Med. 1988. Vol. 4, № 2. P. 225–261.

Bergonie, *J.* De quelques resultants de la Radiotherapie et essaie de fixation drune technique rationelle / J. Bergonie, L. Tribondeau // Comtes Rendu des Seances de Academie des Sciences. 1906. Vol. 143. P. 983–985; пер. с англ. // Radiat. Res. 1959. Vol. 11. № 4. P. 587–588.

Burki, *H.J.* Mammalian cells: damage in late replicating DNA as the most efficient cause reproductive death / Burki, H.J. // Exp. Cell Res. 1974. Vol. 87. № 2. P. 277–280.

Chadwick, *K.H.* Multistage carcinogenesis modeling and the initiation event / K.H. Chadwick, H.P. Leenhouts // Radiat. Oncol. Investig. 1997. Vol. 5. № 3. P. 129–133.

Chen, *Y.-R.* The role of c-Jun N-terminal JNK kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and radiation. Duration of activation my determine cell death and proliferation / Y.-R. Chen [et all.] // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. № 271. P. 31929–31936.

Cofe, *L.J.* Radiation-induced changes in tissue nucleic acids: release of soluble deoxypolynucleotides in the spleen / L.J. Cofe, M.E. Ellis // Radiat. Res. 1957. Vol. 7. № 5. P. 508–511.

Cong, *B.* Ionizing radiation-induced, bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases / B. Cong [et all.] // CellGrowth Diff. 1999. Vol. 10. P. 491–502.

Cook, *P.R.*, Brazell J.A. Supercoil in human DNA / P.R. Cook, J.A. Brozell // J. Cell Sci. 1975. Vol. 19. № 2. P. 261–269.

Creasey, *W.A.* The effect of ionizing radiation on nuclear phosphorylatian in the radiosensitive tissues of the rat / W.A. Creasey, L.A. Stocken // Biochem. J. 1959. Vol. 72. № 7. P. 519–523.

Creenblatt, *M.S.* Mutations in the p53 tumor supressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis / M.C. Creenblatt // Cancer Res. 1994. Vol. 54. № 18. P. 48–54.

Dent, *P.* Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways / P. Dent [et all.] // Radiat. Res. 2003. Vol. 159. № 3. P. 283–300.

Fang, *F.* Evidence that the G,-S G,-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukariotes / F. Fang, J.W. Newport // Cell. 1991. Vol. 66. № 4. P. 731–742.

Filippovic, *I.V.* Supercoiled DNA repair in thymocyte fractions differing in radiosensitivily / I.V. Filippovic [et all.] // Int. j. Radiat. Biol. 1982. Vol. 42. № 1. P. 31–44.

Haimovitz-Friedman, *A.* Radiation-induced signal transduction and stress response / A. Haimovitz-Friedman // Radiat. Res. 1998. Vol. 150, suppl. 5. P. 102–108.

Haunstetter, *A.* Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular desease / A. Haunstetter // Circulat. Res. 1998. Vol. 81. № 11. P. 1111–1129.

Ionizing Radiation: Levels and Effects. A report of the United Nations Scientific Committee of the effects of atomic radiation to the General Assembly, with annexes. Vol. II. Effects. N.Y.: United Nations. 1972. P. 199–447.

Kastan, *M.B.* Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage M.B. Kastan [et all.] // Cancer Res. 1991. Vol. 51. № 23 (part 1). P. 6304–6311.

Kerr, *J.F.K.* Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics / J.F.K. Kerr, A.H. Willie, A.H. Currue // Brit. J. Cancer. 1972. Vol. 26. № 2. P. 239–245.

Khosravi, *R.* Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage / R. Khosravi // Proc. Nat. Acad. Sci. 1999. Vol. 96. № 26. P. 14973–14977.

Komarov, *P.O.* A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy / P.O. Komarov [et all.] // Science. 1999. Vol. 285. № 5434. P. 1733–1737.

Lane, *D.P.* p53, guardian of the genome / D.P. Lane // Nature. 1992. Vol. 358. № 6381. P. 15–16,

Liu X., Zou H., Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis / X. Lin, X. Wang Slaughter // Cell. 1997. Vol. 89. P. 175–184.

Luchnik, *N.V.* The chromosome cycle of DNA / N.V. Luchnik // Studia biophysica. 1971. Vol. 27. № 2. P. 157–164.

Mitchell, *P.* Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling: power transmission by prolicily / P. Mitchell // Trans, Biochem. Soc. 1980. № 4. P. 399–430.

Meller, *F.A.* Medical effects of ionizing radiation. 2 ed / F.A. Meller, A.C. Upton. N.Y. London, 1995. P. 56–94.

Moolgavkar, *S.H.* Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis / S.H. Moolgavkar, A.C.Jr. Knudson // J. Natl. Cancer Inst. 1981. Vol. 66. № 6. P. 1037–1052.

Morgan, *T.H.* The theory of the gene. New Haven (Connect.): YeleUniv / T.H. Morgan. Press, 1926. 286 p.

Murrey, *A.V.* What controls the cell cycle / A.V. Murrey, M.W. Kirschner // Scientific American. 1991. Vol. 264. № 3. P. 56–63.

Nurse, *P.* Universal control mechanism regulating onset M-phase / P. Nurse // Nature. 1990. Vol. 344. № 6266. P. 503–508.

Oda, *E.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of Tp53-induced apoptosis / E. Oda [et all.] // Science. 2000. Vol. 288. № 5468. P. 1053–1058.

Pollycove, *M.* Molecular biology, epidemiology, and the demise of the linear no-threshold (LNT) hypothesis / M. Pollycove, L.E. Feinendegen // C.R. Acad. Sci. III. 1999. Vol. 322. № 2–3. P. 197–204.

Radford, *I.R.* Evidence for a general relationship between" the-induced level of DNA brakage and cell killing after X-irradiation of mammalian cells / I.R. Radford // Int. J. Radiat. Biol. 1986. Vol. 49. № 5. P. 611–620.

Radiation biochemistry. Vol. II. Tissues and body fluids / Ed. Cerber, Kurt I. Altaian. N.Y.; London: Academic Press, 1970. 396 p.

Radiation biology in cancer research / R.E. Afeyn, H.R. Withers. N.Y.: Raven Press, 1980. 270 p.

Resnick, *M.A.* The repair of double-strand breaks in DNA: a model involving recombination / M.A. Resnick // J. Theor. Biol. 1976. Vol. 59. № 1. P. 97–106.

Rubbo, H. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury / H. Rubbo, V. Darley-Ustar, B.A. Freeman // Chem. Res. Toxicol. 1996. Vol. 9. № 5. P. 809–820.

Saran, *M.*, *Bors W.* Radical reactions in vivo ~ an overview / M. Saran, W. Bors // Radiat. Environ. Biophys. 1990. Vol. 29. № 2. P. 249–262.

Schaeffer, *H.J.* Mitogen-activated protein kinase: Specific massages from ubiquitous messengers / H.J. Schaeffer, M.J. Weber // Mol. Cell. Biology. 1999. Vol. 19. № 4. P. 2435–2444.

Sherr, C.J. Cancer cell cycles / C.J. Sherr // Science. 1996. Vol. 274. № 5293. P. 1672–1677.

Singer, *S.* The fluid mosaic model of the structure of cell membranes / S.J. Singer, C.L. Nicolson // Science. 1972. Vol. 175. P. 720–731.

Takata, *M.* Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells / M. Takata [et all.] // EMBO J. 1998. Vol. 17. № 18. P. 5497–5508.

Wang, *X.* Involvement of the MKK6-p38r Cascade in r-radiation-induced cell cycle arrest / X. Wang [et all.] // Molecular and Cellular Biology. 2000. Vol. 20. № 13. P. 4543–4552.

Wang, *X.* Involvement of the MKK6-p38r cascade in r-radiation-induced cell cycle arrest / X. Wang [et all.] // Mol. Cell. Biology. 2000. Vol. 20. № 13. P. 4543–4552.

Ward, *J.F.* DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells:identities, mechanisms of formation and reparability / J.F. Ward // Progr. in Nucl. AcidRes, Mol. Bioi: 1988. Vol. 35. № 1. P. 95–125.

Ward, *J.F.* The yield of DNA double-strand bre'aks produced intracellularly by ionizing radiation: a review / J.F. Ward // Int. J. Radiat. Biol. 1990. Vol. 57. № 6. P. 1141–1150.

Watson, *J.D.* Genetical implications of the structure for deoxyribose nucleic acid / J.D. Watson, F.H.C. Crick // Nature. 1953. Vol. 171. № 4361. P. 964–969.

Williams, *C.T.* Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death / C.T. Williams, C.A. Swith // Cell. 1993. Vol. 74. № 5. P. 777–779.

Willichev, *S.V.* Retrospective dosimetry of accident remediation personnel at the Chernobyl nuclear power planti / S.V. Willichev [et all.]. Kiev: Seda-Stil, 1996. P. 122.

Willie, *A.H.* Cell death: The significance of apoptosis / A.H. Willie, J.F.K. Kerr, A.R. Currie // Int. Rev. Cytol. 1980. Vol. 68. P. 251–306.

Yamane, *K.* A DNA Damage-regulated BRCT-containing protein, TopBPl, Is required for cell survival / K. Yamane, X. Wu, J. Chen // Mol. Cell. Biologv. 2002. Vol. 22. № 2. P. 555–566.

Zhang, *H.* An apoptosis regulator at the intersection of caspases and bcl-2 family proteins / H. Zhang [et all.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. № 6. P. 2597–2602.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ 3

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ 4

ГЛАВА 1. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ С ВЕЩЕСТВОМ 5

1.1. Общая характеристика механизмов взаимодействия ионизирующих излучений с веществом 5
1.2. Взаимодействие электромагнитных ионизирующих излучений с веществом 6
1.2.1. Ядерные взаимодействия γ-квантов 6
1.2.2. Фотоэлектрический эффект 7
1.2.3. Эффект Комптона 8
1.2.4. Образование электрон-позитронных пар 8
1.2.5. Закономерности поглощения γ-излучения 10
1.3. Взаимодействие корпускулярных ионизирующих излучений с веществом 11
1.3.1. Типы взаимодействия α-частиц с веществом 11
1.3.2. Взаимодействие β-излучения с веществом 14
1.3.3. Взаимодействие нейтронов с веществом 15
1.4. Потенциал ионизации, линейная передача энергии 16
1.4.1. Проникающая способность ионизирующих излучений 19
1.4.2. Относительная биологическая эффективность (ОБЭ) различных видов излучения. Связь ОБЭ с ЛПЭ 22
1.5. Дозиметрические величины, используемые в радиобиологии 25
1.5.1. Базовые физические величины 26
1.5.2. Нормируемые величины 31
1.5.3. Операционные величины 40

ГЛАВА 2. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕОРИИ 44

2.1. Принципы попадания и мишени 44
2.2. Гипотеза первичных радиотоксинов и цепных реакций 47
2.3. Структурно-метаболическая теория 49
2.4. Стохастическая теория 50
2.5. Вероятностная модель радиационного поражения клетки 52

ГЛАВА 3. ПОВРЕЖДЕНИЕ И РЕПАРАЦИЯ ДНК 55

3.1. Хромосомные аберрации и их классификация 55
3.2. Классификация радиоиндуцированных хромосомных аберраций . . . 61
3.3. Радиационно-индуцированные генные мутации 63
3.4. Методы детекции хромосомных перестроек 66
3.5. Репарация ДНК 67
3.5.1. Радиационно-индуцированное повреждение ДНК 68
3.5.2. Постпликационная репарация ДНК 73
3.5.3. SOS-репарация 74
3.5.4. Mismatch-репарация (репарация ошибочно спаренных нуклеотидов) 76

ГЛАВА 4. РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА 77

4.1. Механизмы клеточного деления 77
4.2. Регуляция клеточного цикла 85
4.3. Роль внутриклеточных белков в регуляции клеточного цикла 92
4.4. Активация контрольных точек клеточного цикла при облучении . . . 97
4.4.1. G_1-блок клеточного цикла 99
4.4.2. Контрольная точка в S-фазе 99
4.4.3. Контрольная точка в G_2-фазе 100
4.4.4. Особенности функционирования контрольных точек 102

ГЛАВА 5. ТИПЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ И МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАЕМОСТИ 105

5.1. Ранняя реакция на повреждение 105
5.2. Репродуктивная гибель 109
5.3. Определение понятия апоптоза. Признаки апоптоза 110
5.3.1. Причины апоптоза 113
5.3.2. Участие апоптоза в физиологических и патологических процессах 115
5.3.3. Роль усиления или ослабления апоптоза в развитии патологических процессов 117
5.3.4. Про- и антиапоптозные клеточные факторы 118
5.3.5. «Инструктивный» апоптоз 120
5.3.6. Эмбриональный апоптоз 123
5.3.7. Апоптоз стареющих клеток 124
5.3.8. Злокачественные опухоли и апоптоз 125
5.3.9. Радиотерапия и апоптоз 127
5.4. Апоптоз и некроз 130

ГЛАВА 6. КРИВЫЕ ВЫЖИВАНИЯ КЛЕТОК 139

6.1. Кривые репродуктивной и интерфазной гибели клеток 139
6.2. Энергетический обмен и радиационное поражение клеток 143
6.3. Регуляторные сети ответа клеток на повреждающие воздействия . . . 146
6.4. Биологические мембраны и радиобиологическая роль прооксидантной и антиоксидантной системы клетки 147
6.5. Молекулярные механизмы гиперчувствительности к действию радиации 150

ГЛАВА 7. РАДИОБИОЛОГИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ 155

7.1. Основы видовой и индивидуальной радиочувствительности 155
7.2. Лучевые реакции отдельных органов и тканей 160
7.3. Клеточная радиочувствительность 161
7.4. Молекулярные и биохимические основы наиболее значимых радиационно-медицинских эффектов 163

ГЛАВА 8. НЕМИШЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ 165

8.1. Радиационно-индуцированная нестабильность генома 165
8.2. Эффект свидетеля 169
8.3. Адаптивный ответ 176
8.4. Радиационный гормезис 179

ГЛАВА 9. РАДИАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ И РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ НАСЛЕДСТВЕННЫЙ УЩЕРБ 185

9.1. Трансгенерационные изменения при облучении 185
9.2. Феномен радиоадаптации и его роль в реакции организма на ИИ . . . 191
9.3. Внутриутробные эффекты облучения. 198

ГЛАВА 10. РАДИАЦИОННЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ 202

10.1. Эпидемиологические аспекты оценки заболеваемости раком. 202
10.2. Анализ механизмов радиационно-индуцированной онкопатологии 207
10.3. Риск возникновения онкологического заболевания в зависимости от особенностей воздействия ионизирующего излучения 212
10.4. Онкопатология, индуцированная воздействием ионизирующих излучений 215

ТЕРМИНОЛОГИЧЕСКИЙ СЛОВАРЬ 221

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 229

М

Молекулярная и клеточная радиационная биология : учебное пособие / А. Н. Батян [и др.]. – Минск : Вышэйшая школа, 2021. – 238 с.: ил.

ISBN 978-985-06-3312-5.

Материал учебного пособия содержит систематизированные научные знания по молекулярным и клеточным аспектам воздействия ионизирующего излучения на биологические системы. Рассмотрены вопросы взаимодействия ионизирующего излучения с веществом. Освещены вопросы теоретических основ в развитии радиобиологического ответа организма. Особое внимание уделено проблемам выживаемости клеток при облучении и формам клеточной гибели. Большой раздел посвящен немишенным эффектам действия ионизирующего излучения в современнной интерпретации. Подробно описаны механизмы радиационно-индукцированного канцерогенеза.

Для студентов, магистрантов, аспирантов и преподавателей биологических, биомедицинских и экологических специальностей высших учебных заведений, а также научных работников и практиков, работающих в области молекулярной и клеточной радиобиологии, радиационной медицины, радиационной генетики, паталогической физиологии.

УДК
ББК

Учебное издание

Батян Анатолий Николаевич и др.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ РАДИАЦИОННАЯ БИОЛОГИЯ

Учебное пособие

Редактор *Т.К. Хваль*
Художественный редактор *Т.В. Шабунько*
Компьютерная верстка *Ю.Н. Трусевич*
Корректор *Т.К. Хваль*

Подписано в печать 0.09.2021. Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. Уч.-изд. л. Тираж экз. Заказ .

Республиканское унитарное предприятие «Издательство “Вышэйшая школа”».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/3 от 08.07.2013.
Пр. Победителей, 11, 220004, Минск.
e-mail: market@vshph.com http: // vshph.com

Республиканское унитарное предприятие «Издательский центр Белорусского
государственного университета». Свидетельство о государственной регистрации
издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.