

## К 60-ЛЕТИЮ ОБЪЕДИНЁННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ОИЯИ)

## Радиобиологические исследования на ускорителях ОИЯИ

Е.А. Красавин

*Представлены основные этапы развития радиобиологических исследований в Объединённом институте ядерных исследований (ОИЯИ) за полувековой период. С использованием ускорителей Института были выяснены центральные вопросы радиационной биологии: проблема относительной биологической эффективности ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками, механизмы радиационно-индуцированного мутагенеза, вопросы формирования и репарации повреждений генетических структур. Обсуждаются практические задачи космической радиобиологии, решение которых возможно с использованием заряженных частиц высоких энергий.*

**Ключевые слова:** радиобиология, космическая радиобиология, проблема относительной биологической эффективности, радиационно-индуцированный мутагенез, репарация повреждений, ионизирующие излучения

PACS numbers: 87.53. – j, 87.56. – v

DOI: 10.3367/UFNr.0186.201604e.0435

## Содержание

1. Введение (435).
  2. Летальное и мутагенное действие ускоренных тяжёлых ионов на клетки (436).
  3. Повреждения и репарация ДНК при действии ускоренных тяжёлых ионов (439).
  4. Радиационно-физиологические исследования (441).
  5. Заключение (443).
- Список литературы (443).

## 1. Введение

Объединённый институт ядерных исследований (ОИЯИ) является уникальным научным центром, где сосредоточены ядерно-физические установки, которые генерируют ионизирующие излучения с разными физическими характеристиками. В течение многих лет ОИЯИ привлекает специалистов из многих стран для проведения фундаментальных исследований в области не только физики, но и биологии. Ускоренные заряженные частицы различных энергий являются эффективным инструментом в решении многих актуальных проблем современной радиобиологии.

На протяжении полувека применение ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками являлось исключительно плодотворным в решении *фундаментальных задач* радиационной генетики. Они каса-

лись выяснения механизмов биологического действия ионизирующих излучений, индуцированного мутационного процесса; конкретизации физических событий, служащих пусковыми моментами формирования мутаций.

В последние десятилетия возник ряд важных практических задач, решение которых требует детального изучения механизмов биологического действия заряженных частиц высоких энергий. Одна из них связана с проблемами космической радиобиологии. Увеличение дальности и длительности космических полётов выдвинуло на первый план проблему оценки опасности биологического действия высокоэнергетических тяжёлых ионов и разработку мер радиационной безопасности экипажей кораблей.

Ускоренные тяжёлые ионы (преимущественно ядра углерода с энергией 200–300 МэВ на нуклон) начали успешно применяться при лечении онкологических заболеваний. Оптимальное распределение поглощённой дозы излучения в опухоли при облучении тяжёлыми ионами делает этот вид лучевого воздействия весьма перспективным в клинике лучевой терапии.

Важными остаются вопросы нормирования лучевых нагрузок на персонал, работающий в смешанных полях ионизирующих излучений. Эти вопросы связаны с изучением стохастических эффектов радиационного воздействия, индуцируемых излучениями, различающимися по величине линейной передачи энергии (ЛПЭ).

Первые радиобиологические эксперименты в ОИЯИ были начаты в далёком 1959 году на протонном синхротроне Лаборатории ядерных проблем (ЛЯП). В те годы в СССР возник ряд актуальных задач, связанных с началом космической эры и освоением околоземного космического пространства. Острая необходимость быстрого решения этих задач стимулировала проведение широкомасштабных радиобиологических исследований и в конечном итоге определила фронт выполняемых работ на установках ОИЯИ. Запущенные в

Е.А. Красавин. Объединённый институт ядерных исследований, Лаборатория радиационной биологии, ул. Жолио-Кюри 6, 141980 Дубна, Московская область, Российская Федерация  
Tel. (496) 216 57 40. Fax (496) 216 59 48  
E-mail: krasavin@jinr.ru

Статья поступила 6 июля 2015 г.

тот период искусственные спутники Земли и космические корабли обнаружили высокий уровень доз ионизирующих излучений в околоземном космическом пространстве. Выяснилось, что в космосе присутствуют различные виды ионизирующих излучений, имеющих сложный зарядовый и энергетический спектр. При подготовке первых полётов животных и человека в космос не было ясно, как будут вести себя живые организмы в условиях многокомпонентного радиационного воздействия, в том числе при действии протонов высоких энергий, генерируемых Солнцем и исходящих из глубин Галактики. Решить эту проблему стало возможным в наземных условиях, облучая биологические объекты на ускорителе протонов, генерирующем частицы с энергией до 660 МэВ. Целью таких работ являлось установление величины относительной биологической эффективности (ОБЭ) протонов высокой энергии, т.е. того, насколько более (или менее) эффективны высокоэнергетичные протоны по сравнению с рентгеновским или  $\gamma$ -излучением при действии на живые организмы.

Специалистами разных институтов страны, и прежде всего Института медико-биологических проблем (ИМБП) Министерства здравоохранения СССР, были проведены эксперименты по облучению животных (крыс, мышей, собак и обезьян) и растительных объектов, а также культур клеток млекопитающих и человека протонами с энергиями от 25 до 645 МэВ. Изучались реакции разных клеточных и тканевых систем при воздействии острого, фракционированного и хронического протонного облучения. Исследовалось также модифицирующее влияние различных физических и химических агентов на радиационные эффекты. Был выполнен большой объём работ по оценке радиационной опасности при кратковременных и длительных космических полётах человека, по установлению допустимых уровней облучения, велась разработка методов физической защиты от космической радиации и т.д. Исследования показали, что повреждающее действие протонов высоких энергий, оцениваемое по совокупности биологических эффектов, практически не отличается от действия "стандартных" рентгеновских лучей и  $\gamma$ -квантов [1].

## 2. Летальное и мутагенное действие ускоренных тяжёлых ионов на клетки

Радиобиологические исследования на базовых установках ОИЯИ впоследствии стали успешно развиваться радиобиологами, работающими непосредственно в ОИЯИ, в созданном в 1978 г. секторе биологических исследований ЛЯП. Основной задачей этих исследований, которая оставалась одной из ключевых в радиационной биологии на протяжении нескольких десятилетий, было выяснение механизмов, определяющих различия в ОБЭ ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками (и, соответственно, разной ЛПЭ). Несмотря на интенсивную работу над этой проблемой во многих лабораториях мира, искомые механизмы не были раскрыты.

Для объяснения закономерностей летального действия излучений, различающихся по ЛПЭ, на клетки различного происхождения были созданы многочисленные математические модели. Однако в рамках развитых представлений оказалось невозможным объяснить неоднозначную зависимость ОБЭ от ЛПЭ. Главная труд-

ность заключалась в том, что ОБЭ неоднозначно определяется различными факторами, как чисто физическими (отражающими особенности передачи энергии веществу клеток), так и биологическими. Несмотря на то что двойная природа ОБЭ была понята уже давно и, более того, были проделаны работы, в которых предпринимались попытки разделить физическую и биологическую составляющие в целях получения соответствующих формул для вычисления коэффициентов ОБЭ, механизмы, определяющие различия в ОБЭ ионизирующих излучений разного качества, всё-таки не были выяснены, поскольку не было учтено важное обстоятельство — возможная зависимость самой биологической составляющей от ЛПЭ — и вследствие этого возникло ложное представление, будто зависимость ОБЭ от ЛПЭ целиком определяется микроскопическим распределением энергии излучений, переданной генетическим структурам, ответственным за реализацию радиационно-индуцированного эффекта.

В экспериментах, выполненных на ускорителях тяжёлых ионов Лаборатории ядерных реакций, было установлено [2], что биологическая эффективность ионизирующих излучений разного качества по их летальному действию на клетки прокариот и эукариот определяется двумя факторами различной природы: физическими характеристиками излучений и биологическими свойствами самих клеток — их способностью восстанавливаться после лучевых повреждений (рис. 1).

Главный вывод, сделанный в результате проведённых экспериментальных и теоретических исследований, на основе которого была решена проблема ОБЭ, заключался в том, что способность к репарации повреждений ДНК зависит от ЛПЭ, так как характер летальных повреждений варьируется и также является зависимым от ЛПЭ. Было показано, что при действии излучений с возрастающими значениями ЛПЭ увеличивается выход кластерных, трудно репарируемых, повреждений ДНК. С учётом этих результатов радиобиологами ОИЯИ был выполнен широкий спектр исследований по мутагенному

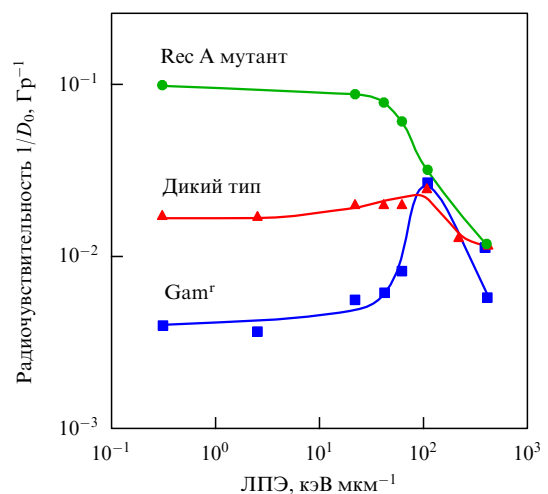


Рис. 1. Зависимость радиочувствительности бактерий с блокированной способностью к репарации повреждений ДНК (Rec A мутант), нормальной репарацией (дикий тип) и повышенной эффективностью репарационных процессов (GamF) от ЛПЭ тяжёлых заряженных частиц.

действию излучений с разными физическими характеристиками. Были разработаны математические модели летального и мутагенного действия излучений разных типов на бактерии, проведено изучение закономерностей и механизмов индукции прямых и обратных мутаций у клеток прокариот [3].

Исключительный интерес для понимания молекулярных механизмов формирования как генных, так и структурных мутаций в клетках при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками, различающихся по ЛПЭ в широком диапазоне, представляет сбор информации не только о суммарном выходе мутаций различного типа, но и о частоте образования тех или иных мутаций в облучённых клетках с различным генотипом. Получение такого рода данных в экспериментах на клетках млекопитающих является крайне трудной, хотя и очень важной практической и научной задачей. В связи с этим исследования на бактериальных клетках представляются необходимой ступенью в выяснении механизмов индуцированного мутагенеза, поскольку у бактерий детально изучена структурно-функциональная организация генетического аппарата, существуют различные репарационно-дефицитные мутанты.

Полученные материалы по мутагенному действию излучений широкого диапазона ЛПЭ [4] позволили понять механизмы, лежащие в основе выявленных закономерностей. На основе исследований индукции как прямых, так и обратных генных мутаций была найдена степенная зависимость частоты образования мутаций от дозы излучения (рис. 2).

В логарифмическом масштабе дозовые зависимости представляют собой прямые с тангенсом угла наклона, равным 1,7–1,8, что свидетельствует о степенном, близком к квадратичному, характере этих зависимостей. Наиболее высокая эффективность индукции мутаций наблюдается в экспериментах с ускоренными ионами гелия с ЛПЭ  $\approx 20$  кэВ мкм<sup>-1</sup>. При действии ионов с большими ЛПЭ мутагенная эффективность снижается.

Сохранение квадратичного характера зависимости частоты мутирования от дозы облучения при действии тяжёлых заряженных частиц обусловлено рядом факторов. Микродозиметрический анализ выявляемых закономерностей свидетельствует о том, что при действии разных доз ионизирующих излучений в облучённой популяции можно выделить три типа субпопуляций клеток: неповреждённые выживающие клетки; летально повреждённые невыживающие клетки; умеренно повреждённые клетки, которые после завершения процесса репарации также входят в класс выживающих клеток. При увеличении ЛПЭ излучений возрастает доля неповреждённых клеток и уменьшается доля летально повреждённых, через которые прошли частицы сердцевинной трека. В результате этого мутации образуются преимущественно в субпопуляции, повреждённой прохождением  $\delta$ -электронов, и в той небольшой фракции клеток, через которые прошли одна и большее количество частиц сердцевинной трека при условии, что эти клетки смогли отрепарировать возникшие повреждения и не погибли. На основании этого можно было объяснить сохранение характера дозовых зависимостей мутагенеза при действии излучений, различающихся по ЛПЭ.

Поскольку характер передачи энергии  $\delta$ -электронов веществу при действии электромагнитных и корпускулярных излучений не различается между собой, вид зависимости  $N_m/N$  от  $D$ , где  $N_m/N$  — отношение числа мутантных клеток к общему числу клеток в облучённой популяции,  $D$  — доза, при действии излучений разного качества остаётся неизменным. Следовательно, при действии тяжёлых заряженных частиц с высокими значениями ЛПЭ (ЛПЭ  $\geq 100$  кэВ мкм<sup>-1</sup>), когда при прямом прохождении треков частиц через чувствительные структуры клетки преимущественно погибают, в выживающих клетках имеет место так называемый  $\delta$ -электронный мутагенез. При действии же на клетки ускоренных лёгких ионов или ускоренных тяжёлых заряженных частиц высоких энергий с ЛПЭ<sub>∞</sub>  $\leq 100$  кэВ мкм<sup>-1</sup>, когда чув-

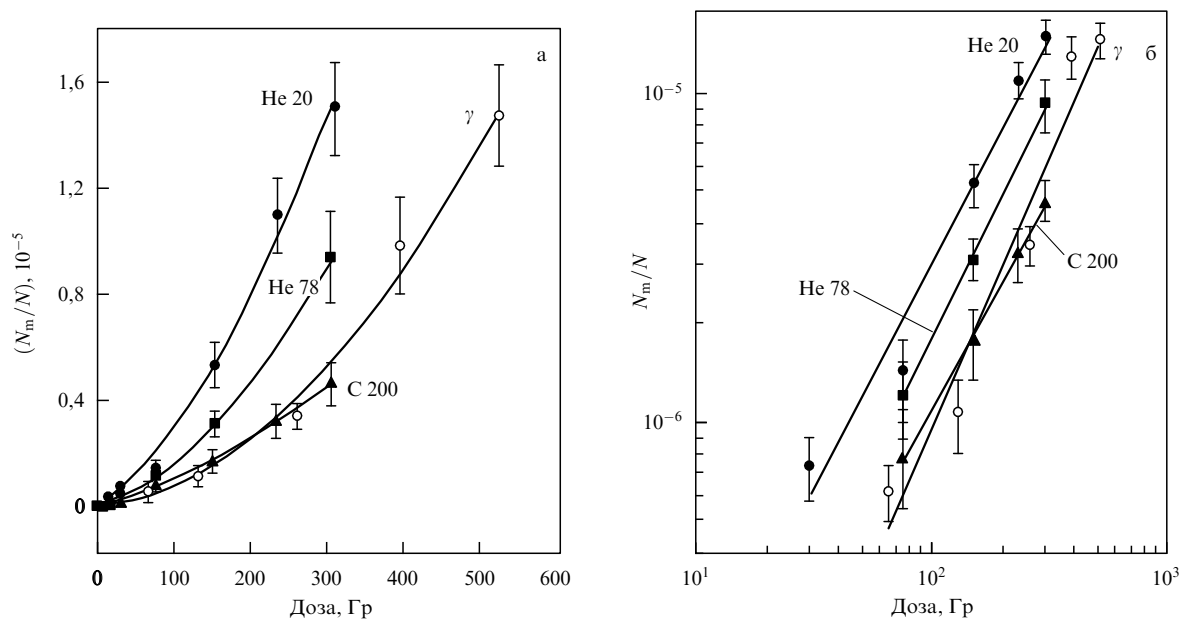


Рис. 2. Частота образования tonV мутаций при действии излучений с разной ЛПЭ (He20, He78, C200 обозначают соответственно величину ЛПЭ тяжёлых заряженных частиц): (а) линейный масштаб, (б) логарифмический масштаб.

ствительные структуры испытывают прямое воздействие треков, имеет место "сердцевинно-трековый мутагенез". С учётом вышеизложенного становится понятным сохранение характера дозовых кривых мутагенеза у клеток *E. coli* и *Bacillus subtilis* при возрастании ЛПЭ частиц.

Данные, полученные на ускорителях тяжёлых ионов, позволили прийти к заключению о том, что квадратичный характер кривых мутагенеза обусловлен необходимостью реализации и "взаимодействия" двух независимых друг от друга событий "попадания". Первое из них связано с возникновением премутационного повреждения в изучаемом локусе, а второе — с образованием повреждения, индуцирующего систему SOS-репарации, которая и способствует закреплению изменения в бактериальной ДНК в виде мутаций.

В связи с тем, что SOS-репарация является решающим фактором в реализации индуцированного мутационного процесса, важен анализ современных молекулярных механизмов организации SOS-системы<sup>1</sup> у бактерий *E. coli*.

Была разработана молекулярная модель индуцированного мутагенеза, позволяющая описать магистральные пути трансформации первичных нарушений структуры ДНК (премутационных повреждений) в мутации [5]. Согласно этой модели, закрепление премутационного повреждения в мутацию точкового типа при действии ионизирующих излучений есть результат работы различных энзиматических механизмов, и в том числе, как одного из главных, — мультиферментного комплекса, включающего в себя индуцибельную ДНК-полимеразу V (UmuD<sub>2</sub>C), RecA-протеазу, SSB-белки, субъединицы ДНК-полимеразы III.

На основе молекулярной модели была разработана математическая модель, описывающая мутационный процесс в бактериальных клетках *E. coli* при действии ультрафиолетового (УФ) излучения [6]. По сути, был предложен новый подход к теоретическому описанию явления индуцированного мутагенеза в бактериальных клетках. Впервые построена модель, описывающая индуцированный мутационный процесс посредством детального математического описания ключевых белковых взаимодействий в ходе SOS-ответа бактерий *E. coli*. В рамках одного модельного подхода удалось проследить весь путь от возникновения первичного повреждения структуры ДНК до закрепления его в мутацию. Разработанные модельные представления позволили впервые предсказать динамику концентраций димеризованных продуктов гена *umuD*, а также двух регуляторных комплексов SOS-системы: UmuD<sub>2</sub>C и UmuDD<sub>2</sub>C. Такой подход позволил детально смоделировать механизм translesion-синтеза, ответственного за процесс закрепления премутационных повреждений в мутации. В расчётах с применением построенной модели была установлена связь между эффективностью реализации translesion-синтеза и выходом генных мутаций. Вычисления, выполненные на примере регуляторного гена *lacI* бактерий *E. coli*, показали совпадение результатов моделирования с экспериментальными данными о частоте

образования *lacI*<sup>-</sup> мутаций в зависимости от флюенса энергии УФ-излучения.

На основании этих подходов возможен дальнейший математический анализ основных этапов мутационного процесса при действии ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки *E. coli*. Конечно, это задача гораздо более сложная, но вполне реализуемая. Для её успешного решения, прежде всего, необходимы экспериментальные данные, касающиеся кинетики образования и деградации основных генных продуктов, участвующих в формировании мультиферментного комплекса — ДНК-полимеразы V.

В экспериментах с использованием ускоренных тяжёлых ионов удалось показать, что, в отличие от генных, частота образования делеционных мутаций линейно возрастает с увеличением дозы для всех видов использованных излучений [4] (рис. 3). Наибольшей эффективностью обладают ионы с ЛПЭ  $\approx 50$  кэВ мкм<sup>-1</sup>. Ускоренные ионы с большей ЛПЭ вызывают меньший биологический эффект. Следовательно, характер дозовых зависимостей по критерию индукции делеционных мутаций у клеток *E. coli* совершенно отличается от ранее рассмотренных зависимостей, полученных для генных мутаций. В последнем случае наблюдается степенная, близкая к квадратичной, зависимость. Дозовые зависимости индукции делеционных мутаций, описываемые линейными функциями, обусловлены другими механизмами их формирования по сравнению с генными мутациями. Линейный характер зависимости образования делеций при  $\gamma$ -облучении бактериальных клеток обусловлен тем, что, в отличие от генных мутаций, молекулярной основой первичных повреждений, ведущих к образованию делеций, являются не повреждения оснований, а двунитевые разрывы ДНК. Для реализации премутационных повреждений данного типа в структурную

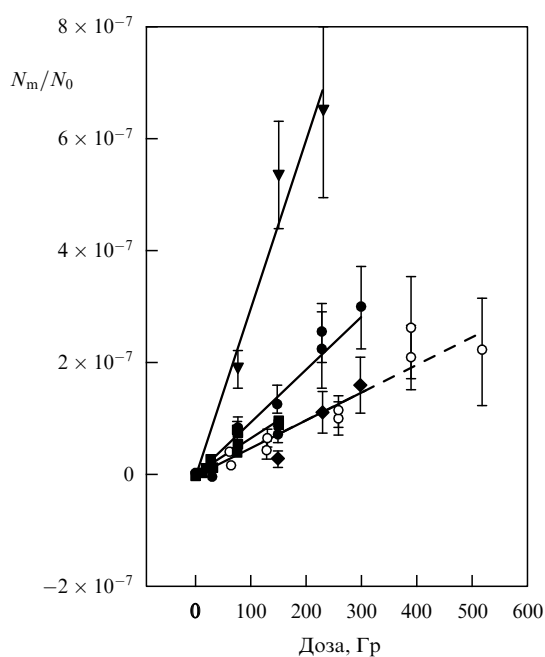


Рис. 3. Зависимость частоты образования *tonBtrp*<sup>-</sup> мутаций от дозы излучений с разной ЛПЭ. Светлые кружки —  $\gamma$ -лучи; темные кружки — ионы He (20 кэВ мкм<sup>-1</sup>); треугольники — ионы He (50 кэВ мкм<sup>-1</sup>); квадраты — ионы He (78 кэВ мкм<sup>-1</sup>); ромбы — ионы <sup>12</sup>C (200 кэВ мкм<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup> Защитная система, включающаяся в клетке в ответ на повреждения ДНК, произошедшие в клеточном цикле и не устранённые при репарации ДНК, и начало мутагенеза. (Примеч. ред.)

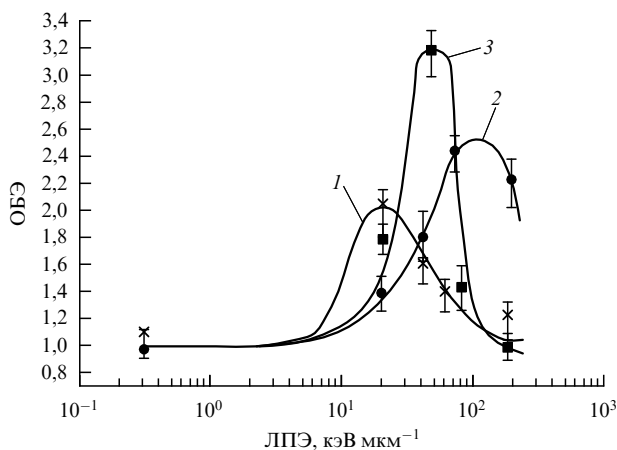


Рис. 4. Зависимость ОБЭ от ЛПЭ, оцениваемая по различным критериям облучения. 1 — индукция *topV* мутаций, 2 — летальное действие, 3 — индукция *topVtrp<sup>-</sup>* делеций.

мутацию не требуется индукции системы SOS-репарации, которая играет ключевую роль в формировании генных мутаций.

Результаты выполненных исследований показали, что биологическая эффективность тяжёлых заряженных частиц, оцениваемая по индукции делеционных мутаций, возрастает с увеличением ЛПЭ, так же как для летальных эффектов облучения и индукции точечных мутаций. Однако положение максимумов зависимости ОБЭ от ЛПЭ для рассматриваемых эффектов облучения не является инвариантным (рис. 4).

Для летального действия наибольшие значения ОБЭ наблюдаются при облучении частицами с ЛПЭ  $\approx 100$  кэВ мкм<sup>-1</sup>. По критерию индукции генных мутаций величина максимума приходится на значения ЛПЭ  $\approx 20$  кэВ мкм<sup>-1</sup>. Для делеционных мутаций эта величина составляет  $\approx 50$  кэВ мкм<sup>-1</sup>. На основании этого был сделан вывод о том, что различия в положении максимумов зависимости ОБЭ от ЛПЭ для летальных и мутагенных эффектов облучения обусловлены разным характером повреждений ДНК, приводящих к реализации генного мутагенеза и летальных эффектов. В первом случае преимущественно повреждаются основания, во втором — происходят двунитевые разрывы (ДР) ДНК.

Микродозиметрический анализ выхода кластерных одностранных разрывов (ОР) и ДР ДНК в зависимости от ЛПЭ свидетельствует о том, что оба типа зависимостей описываются кривыми с локальным максимумом. Однако для кластерных ОР положение максимума сдвинуто почти на порядок в область меньших значений ЛПЭ. Это обстоятельство может объяснить различия в положении максимумов зависимостей ОБЭ от ЛПЭ для летальных эффектов облучения и индукции генных мутаций.

Облучение клеток млекопитающих тяжёлыми ионами выявило их высокое мутагенное действие [7]. Величина ОБЭ для исследованных тяжёлых ионов по отношению к действию  $\gamma$ -квантов описывается кривой с локальным максимумом при ЛПЭ  $\sim 80$ – $100$  кэВ мкм<sup>-1</sup>. В предположении, что мутационный процесс в клетках млекопитающих может сопровождаться нарушением структурной целостности хромосомного аппарата и проявиться в хромосомной нестабильности клеток, были предприняты исследования по выделению одиночных

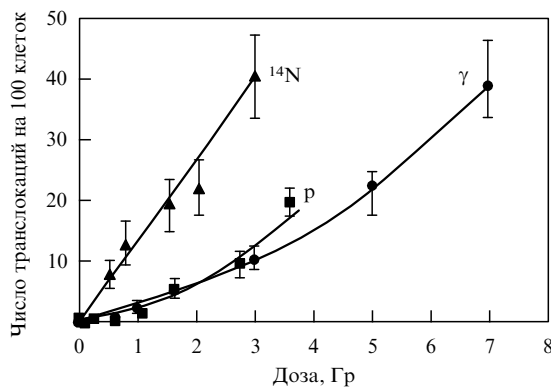


Рис. 5. Дозовые зависимости частоты транслокаций хромосомы-1 после облучения лимфоцитов крови человека  $\gamma$ -лучами (кружки), протонами с энергией 1 ГэВ (квадраты) и ионами азота <sup>14</sup>N (треугольники).

мутантных колоний, из которых были выращены субклоны и проведён их цитогенетический анализ [8]. При цитогенетическом анализе наблюдалась гетерогенность спонтанных и радиационно-индуцированных HPRT-мутантных субклонов по исследованным цитогенетическим показателям (митотической активности, анеуплоидии, уровню хромосомных aberrаций). Как показали исследования, последствия мутационных событий проявились в возникновении геномной (по числу хромосом в клетках) и хромосомной (по уровню aberrаций хромосом) нестабильности в популяциях потомков мутантных клеток.

С использованием ускоренных тяжёлых ионов были изучены закономерности индукции разными типами излучений нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций в клетках человека [9]. Для общего числа хромосомных aberrаций была выявлена степенная зависимость эффекта от дозы редкоизионизирующих излучений (протоны и  $\gamma$ -кванты) (рис. 5). Она модифицируется в линейную при воздействии тяжёлых ионов. Однако наблюдается снижение эффектов при воздействии высоких доз таких излучений, что является следствием существенной задержки митозов, особенно тяжело повреждённых клеток с множественными aberrациями хромосом. В исследованиях были использованы ДНК-пробы, специфичные для хромосом 1 и 2 генома лимфоцитов человека. Эти хромосомы являются наиболее крупными в геноме человека, и их повреждения могут происходить с большей вероятностью при воздействии такого неблагоприятного фактора, как ионизирующие излучения. С помощью FISH-анализа (от англ. Fluorescence *In Situ* Hybridization — флуоресцентная гибридизация *in situ*) выявлена высокая частота образования таких стабильных aberrаций этих хромосом, как транслокации. Коэффициенты ОБЭ излучений с ЛПЭ, равной 80 кэВ мкм<sup>-1</sup>, достигали значения 3 и более.

### 3. Повреждения и репарация ДНК при действии ускоренных тяжёлых ионов

Как указывалось в разделе 2, действие тяжёлых заряженных частиц индуцирует многие эффекты, резко отличающиеся от наблюдаемых при облучении электромагнитными видами излучений. В значительной степени это

обусловлено спецификой передачи энергии тяжёлых заряженных частиц генетическим структурам клеток. В случае облучения  $\gamma$ -квантами поглощённая доза передаётся объёму вещества случайно распределёнными многочисленными актами передачи энергии малыми порциями. Та же доза облучения может быть передана такому же объёму вещества при прохождении через него всего лишь одной тяжёлой заряженной частицы. Особый характер передачи энергии тяжёлых ионов генетическим структурам обуславливает формирование качественно иных типов повреждений ДНК, нежели при действии электромагнитных видов ионизирующих излучений. И, прежде всего, это касается формирования наиболее тяжёлых нарушений, таких как ДР ДНК.

Пересечение тяжёлой заряженной частицей участка ДНК приводит не только к нарушению целостности двух комплементарных нитей ДНК, но и к повреждению других молекулярных структур, прилегающих к данному сайту. Такие кластерные повреждения наиболее трудны для репарации восстановительными системами клеток. Они являются молекулярной основой гибели клеток, их злокачественной трансформации, различного рода мутаций хромосом.

Для выявления закономерностей и механизмов процессов формирования и репарации радиационно-индуцированных ДР ДНК в Лаборатории радиационной биологии (ЛРБ) ОИЯИ были предприняты тщательные исследования действия излучений с разными физическими характеристиками на клетки человека эффективными современными методами, позволяющими изучать такие процессы в ядрах отдельных клеток: методом иммуноцитохимического окрашивания клеток при помощи конъюгированных с разными флуоресцентными красителями антител, специфичных к белкам (метод ДНК-фокусов), и методом ДНК-комет.

Метод ДНК-фокусов основан на свойстве определённых белков "узнавать" формирующиеся ДР ДНК в ядрах и участвовать в развитии репарационного процесса. Одним из начальных этапов формирования клеточного ответа на возникший ДР ДНК и активации систем репарации является фосфорилирование гистона H2AX. Фосфорилированный гистон H2AX ( $\gamma$ H2AX) может быть определён вблизи ДР ДНК и служит сигналом для привлечения других белков в сайты возникновения ДР ДНК. События фосфорилирования гистона H2AX могут быть визуализированы как отдельные ядерные фокусы методом иммуноокрашивания, который основан на специфичном связывании антител с антигенами. Для каждого белка, или антигена, можно синтезировать специфичное только для него антитело (первичное антитело). Первичное антитело соединяется с исследуемым белком, после чего к первичному антителу присоединяется специфичное для него вторичное антитело. Вторичное антитело несёт с собой флуоресцентную метку, которая позволяет визуализировать исследуемый белок. Помимо гистона  $\gamma$ H2AX, использование данной методики позволяет визуализировать некоторые белки, участвующие в репарации ДР ДНК (такие как 53BP1).

С использованием метода иммуноцитохимического окрашивания и конфокальной микроскопии международной группой радиобиологов [10] были получены трёхмерные изображения ядер фибробластов человека, облучённых  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  (ЛПЭ = 0,3 кэВ мкм<sup>-1</sup>) и ускоренными ионами  $^{11}\text{B}$  (ЛПЭ = 135 кэВ мкм<sup>-1</sup>) (рис. 6).

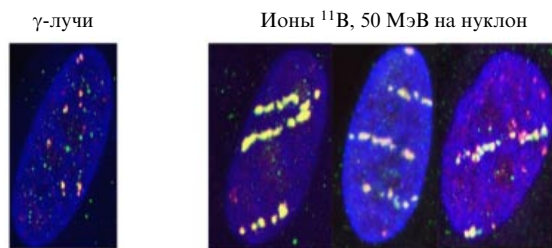


Рис. 6. Формирование ДНК-фокусов в клетках человека при  $\gamma$ -облучении и действии ускоренных ионов бора.

Для исследования кинетики репарации повреждений ДНК при действии ионов  $^{11}\text{B}$  облучение образцов проводилось фронтально относительно клеточного монослоя.

Облучение образцов под малым углом ( $10^\circ$ ) направления пучка позволило проанализировать формирование и структуру кластерных повреждений ДНК вдоль трека прохождения частицы. Для количественной оценки индукции и репарации повреждений ДНК проводился подсчёт колокализированных  $\gamma$ H2AX и 53BP1 фокусов, являющихся маркерами ДР ДНК.

В этих экспериментах была изучена кинетика формирования и элиминации радиационно-индуцированных  $\gamma$ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах фибробластов при действии  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  и ускоренных ионов  $^{11}\text{B}$ . Было продемонстрировано, что при действии ускоренных ионов  $^{11}\text{B}$  в фибробластах человека формируется больше  $\gamma$ H2AX/53BP1 фокусов, чем при действии  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  (рис. 7).

Максимум выхода радиационно-индуцированных фокусов при  $\gamma$ -облучении достигается через 1 ч ( $\sim 25$  фокусов на 1 клетку) после облучения, и через 4 ч большая часть фокусов ( $\sim 80\%$ ) элиминируется. Наибольший выход  $\gamma$ H2AX/53BP1 фокусов при облучении ускоренными ионами  $^{11}\text{B}$  наблюдается через 45 мин пострадиационной инкубации ( $\sim 72$  фокуса на 1 клетку). Через 24 ч после облучения в клетках, подвергшихся воздействию ускоренных ионов  $^{11}\text{B}$ , количество радиационно-индуцированных фокусов значительно превышает это значение в клетках, облучённых  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$ , что свидетельст-

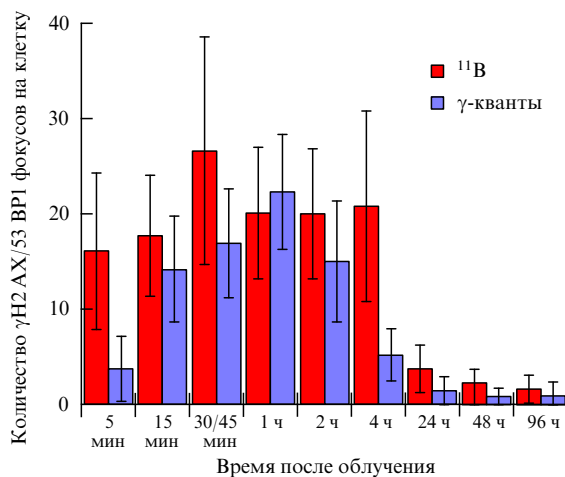


Рис. 7. Кинетика формирования и элиминации  $\gamma$ H2AX/53BP1 фокусов при действии  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  и ускоренных ионов  $^{11}\text{B}$ .

ует о наличии более сложных повреждений, индуцированных ускоренными ионами. Различный характер формирования ДР ДНК при  $\gamma$ -облучении клеток и действии тяжёлых заряженных частиц был проиллюстрирован при сопоставлении материалов после облучения  $\gamma$ -квантами  $^{60}\text{Co}$  и ускоренными ионами  $^{11}\text{B}$  в дозе 1 Гр в плоскости, перпендикулярной направлению распространения пучка, и под углом  $10^\circ$ . В последнем случае было выявлено, что частица, проходя через ядро, формирует трек, состоящий из нескольких близко расположенных радиационно-индуцированных фокусов. Показано, что кластерные повреждения ДНК формируются вдоль трека прохождения частицы уже в первые минуты после облучения.

Поскольку инициирующим сигналом в индукции апоптоза — программируемой клеточной гибели — являются ДР ДНК, количественные и качественные различия в образовании ДР ДНК при действии излучений электромагнитной природы и тяжёлых ионов, и в частности снижение репарационной способности клеток в последнем случае, должны проявляться в реализации апоптотического ответа клеток. Это подтвердилось в выполненных экспериментах [11] по облучению лимфоцитов крови человека  $\gamma$ -квантами и ускоренными ионами кислорода и неона (ЛПЭ = 170 и 180 кэВ мкм $^{-1}$  соответственно).

Цитогенетиками ЛРБ на ускорителях тяжёлых ионов выполнены широкомасштабные исследования мутагенного действия ионизирующих излучений разного качества на клетки млекопитающих. На клетках китайского хомячка при облучении  $\gamma$ -квантами и ускоренными ионами  $^{11}\text{B}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{20}\text{Ne}$  (диапазон ЛПЭ от 50 до 153 кэВ мкм $^{-1}$ ) исследованы закономерности формирования HPRT-мутаций. Обнаружено, что проявление мутаций зависит от сроков высева облучённых клеток в селективную питательную среду с 6-тиогуанином (времени экспрессии мутаций) и от ЛПЭ излучений. Частота спонтанного и радиационно-индуцированного мутагенеза при экспрессии в течение четырёх суток составила около  $1,2 \times 10^{-5}$ . При более продолжительном периоде экспрессии отмечено увеличение уровня мутагенеза примерно в 3 раза до максимального значения.

Положение этого максимума зависело от ЛПЭ ускоренных ионов. С увеличением ЛПЭ значение максимума смещалось в сторону более продолжительного периода экспрессии (рис. 8). Так, максимальный уровень

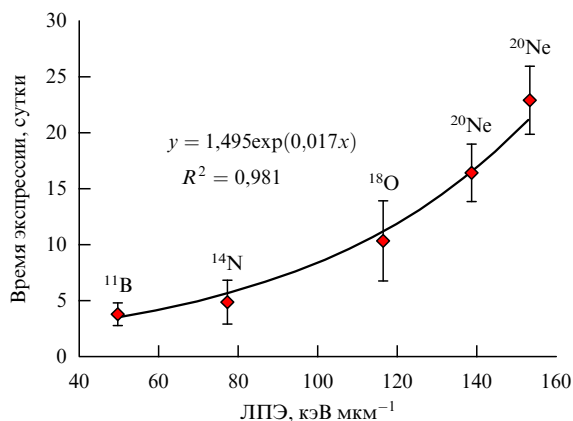


Рис. 8. Максимальный уровень радиационно-индуцированного мутагенеза в клетках китайского хомячка в зависимости от времени экспрессии и ЛПЭ ускоренных ионов.

мутагенеза наблюдался через 11 суток после облучения ионами кислорода  $^{18}\text{O}$  (ЛПЭ  $\sim 116$  кэВ мкм $^{-1}$ ) и по прошествии 23 суток после облучения ионами неона  $^{20}\text{Ne}$  (ЛПЭ  $\sim 153$  кэВ мкм $^{-1}$ ). Эти сроки соответствуют примерно 40–50 поколениям клеток (один цикл деления клеток китайского хомячка составляет 11–12 ч). В дальнейшем частота радиационно-индуцированного возникновения мутантов снижалась до уровня спонтанного мутагенеза при посеве через 30–45 суток. На основании ранее проведённых исследований можно предположить, что повышение уровня радиационно-индуцированного мутагенеза определяется возросшей хромосомной нестабильностью популяции облучённых клеток и его проявление при разных временах экспрессии зависит от тяжести первоначальных повреждений.

При выявлении и селекции мутантных субклонов было отмечено появление мутантов с замедленным ростом по сравнению с интактным контролем. Замедление роста многих мутантных субклонов в селективной среде с 6-тиогуанином могло определяться возникновением мутаций, приводящих к снижению активности HPRT-фермента или снижению его синтеза. В этих случаях жизнеспособность мутантной популяции могла обеспечиваться только за счёт клеток, не успевающих в течение клеточного цикла утилизировать пуриновый аналог. Также обнаружены нестандартные типы роста мутантных субклонов, выделенных из клеток китайского хомячка, облучённых ускоренными ионами  $^{18}\text{O}$  (ЛПЭ  $\sim 130$  кэВ мкм $^{-1}$ ) в дозах 0,5, 1 и 2 Гр. В одинаковых условиях роста некоторые мутанты демонстрируют необычные морфологические признаки по сравнению с контрольной популяцией клеток: ажурный, цепочечный и звёздчатый характер роста. Зафиксировано появление колоний до достижения монослоя клеток мутантных субклонов. Эти признаки могут свидетельствовать об инициации процесса злокачественной трансформации клеток.

#### 4. Радиационно-физиологические исследования

В последние годы спектр работ, выполняемых в ЛРБ, значительно расширился в сторону радиационно-физиологических исследований. Это обусловлено необходимостью решения практических задач, стоящих перед космической радиобиологией. В ходе пилотируемых межпланетных полётов высокую опасность для экипажей кораблей могут представлять тяжёлые заряженные частицы, входящие в состав галактических космических лучей (ГКЛ). Диапазон энергий частиц, приходящих из глубин Галактики, крайне широк и простирается до сверхвысоких энергий  $\sim 10^{20}$  эВ. Обеспечить защиту организма от их повреждающего действия методами физической защиты в ближайшей перспективе не представляется возможным.

Как отмечалось в разделе 3, при прохождении тяжёлых ионов (например, ионов железа) через вещество распределение передаваемой биологическим структурам энергии принципиально отличается от такового в случае электромагнитных видов ионизирующих излучений (рентгеновского излучения, гамма-квантов), что обуславливает специфичность радиационного воздействия ГКЛ на организм в условиях полёта в дальнем космосе, где могут развиваться радиационные синдромы

совершенно иного типа, чем наблюдаемые при действии редкоизионизирующих космических излучений (например, протонов высоких энергий). Это обстоятельство необходимо учитывать при оценке радиационного риска для космонавтов в условиях полёта вне магнитосферы Земли.

Используемая в настоящее время концепция риска основана на введении обобщённого дозиметрического функционала в качестве критерия и количественной меры радиационной опасности. Обобщённая доза складывается из доз облучения, вызывающих *непосредственные* и *отдалённые* эффекты. Ближайшие радиационно-индуцированные эффекты возникают в ходе полёта, а отдалённые нарушения формируются в течение последующей жизни. При расчёте дозы для ближайших и отдалённых эффектов облучения вводятся коэффициенты, учитывающие влияние на радиобиологический эффект качества излучения (включая и тяжёлые заряженные частицы различных энергий), распределение дозы во времени, распределение дозы по телу человека, а также коэффициенты модификации лучевой реакции организма за счёт других факторов космического полёта. В качестве ближайших эффектов облучения рассматриваются нарушения костномозгового кроветворения, кожных покровов, других органов и тканей организма. Отдалённые эффекты облучения для космонавтов в нормативных документах различных стран обычно связываются с развитием *опухолевых* процессов в организме.

Однако при оценке риска радиационного воздействия тяжёлых ядер ГКЛ в ходе межпланетной миссии необходимо иметь в виду возможное возникновение нарушений со стороны центральной нервной системы (ЦНС) космонавтов [12]. В экспериментах по облучению лабораторных животных высокоэнергетичными ионами железа в дозах, соответствующих значениям потоков галактических ядер железа, которые реализовались бы при полёте к Марсу, выявляются различные отклонения со стороны ЦНС, такие как выраженное нарушение пространственной ориентации, угнетение когнитивных функций. Свидетельства о развитии радиационных синдромов при действии тяжёлых заряженных частиц на структуры головного мозга, приводящих к нарушениям его интегративной целостности, дают основания рассматривать ЦНС как критическую систему при оценке риска радиационного воздействия на организм космонавтов при осуществлении межпланетных полётов.

В ЛРБ проводятся исследования морфологических и функциональных повреждений в сетчатке глаза экспериментальных животных, нарушений уровня нейротрансмиттеров в различных отделах мозга при облучении тяжёлыми заряженными частицами [13]. Проведены эксперименты по изучению связи повреждения и репарации ДНК с дегенеративными изменениями в сетчатке после воздействия на мышей ионизирующей радиации ( $\gamma$ -излучения и протонов) и генотоксического агента метилнитрозомочевина (МНМ). Гамма-излучение вызывает главным образом ОР ДНК, равномерно распределённые по всему геному. Протоны же более эффективны в индукции ДР, локализующихся в области трека частицы. ДР являются летальным повреждением из-за их высокой эффективности в индукции апоптоза в делящихся клетках. Метилирующий агент МНМ вызывает в ДНК безразрывные дефекты — метилированные основания, апуриновые и апириимидиновые (АП) сайты. В

середине 1990-х годов была обнаружена способность МНМ индуцировать апоптоз фоторецепторов в сетчатке после однократного внутрибрюшинного введения животным в дозе  $> 60$  мг  $\text{кг}^{-1}$ . В работе использовали МНМ как позитивный контроль на апоптоз в сетчатке. Таким образом, три используемых агента охватывают основные типы повреждений ДНК и механизмы их репарации. Полученные результаты подтверждают тезис о высокой радиоустойчивости зрелой сетчатки мышей. Наблюдается полная репарация ДНК после действия  $\gamma$ -излучения и протонов в дозе 14 Гр. Увеличенная экспрессия в белках сетчатки, ассоциированных с клеточной гибелью (апоптозом), нормализуется спустя 12 ч после облучения. К этому времени завершается репарация индуцированных излучениями разрывов в ДНК. Это говорит о том, что в сетчатке эти белки не индуцируют апоптоз, а скорее всего, способствуют репарации ДНК и восстановлению повреждённых клеток.

Увеличение дозы воздействия до 25 Гр вызывало заметные морфологические изменения в фоторецепторном слое сетчатки. Эти изменения выражаются в дегенерации наружных сегментов фоторецепторов, а также в снижении плотности и толщины их ядерного слоя. Дегенерация нарастает во времени и связана с гибелью фоторецепторов, протекающей по механизму апоптоза. На апоптоз указывает возросшая экспрессия проапоптотических белков. Таким образом, сравнительно высокая радиоустойчивость сетчатки и активный механизм пострадиационной репарации, удаляющий индуцированные излучениями разрывы ДНК, указывают на существование генотоксического порога, который обуславливает нелинейный характер зависимости эффекта от дозы облучения.

В последнее время в исследованиях, ведущихся в этой области, использовалась электроретинография (ЭРГ) как интегральный физиологический показатель функциональной целостности сетчатки. Регистрация электроретинограммы, индуцируемой вспышками белого света с разной интенсивностью, позволяет получить полную картину функциональной активности сетчатки у мышей при жизни. Оказалось, что профиль ЭРГ более чувствителен к генотоксическому действию, чем морфологические и клеточные показатели. С помощью этого подхода обнаружена способность сетчатки к адаптивному ответу и к восстановлению по показателю функциональной активности. В настоящее время в секторе радиационной физиологии ЛРБ ОИЯИ исследуется возможный вклад в восстановление сетчатки со стороны глиальных клеток Мюллера. Эти клетки являются немногочисленной популяцией ретинальных клеток, сохраняющих способность в ответ на травмирующий стресс увеличивать свою пролиферацию, мигрировать в слои внешней сетчатки, дифференцироваться в фоторецепторы и продуцировать эндогенные нейропротекторы, защищающие фоторецепторы сетчатки.

На пучках протонов с энергией 170 МэВ в пике Брэгга был выполнен цикл работ по влиянию облучения в дозах 1 и 2 Гр на процессы обучения, воспроизведения навыков и концентрацию моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре, прилежащем ядре (*nucleus accumbens*), гипоталамусе, стриатуме и гиппокампе крыс [13]. В Т-образном лабиринте проводили дискриминантное обучение с пищевым подкреплением. Крыс обучали пять дней, из которых со второго до пятого дня животные



выявили значимый уровень обучения по сравнению с первым днём. После облучения, в шестой день, наметилась тенденция к снижению эффективности выполнения теста, достигшая значимых различий в седьмой день тестирования. Облучение протонами в дозах 1 и 2 Гр в пике Брэгга не повлияло на выработку и воспроизведение рефлекса пассивного избегания. То же самое воздействие вызывает уменьшение концентрации катехоламинов в префронтальной коре и концентрации 3-МТ (3-метокситирамина) — метаболита дофамина — в стриатуме. На основании обнаруженных нарушений нейрохимических показателей в соответствующих структурах мозга можно достаточно логично объяснить наблюдаемые нарушения поведения.

Для решения проблемы радиационного риска при полётах в дальний космос, обусловленного влиянием тяжёлых ядер галактического излучения, необходимо комплексное изучение поражающего действия заряженных частиц на молекулярном, клеточном и организменном уровнях биологической организации. Наиболее важны здесь исследования нарушений высших интегративных функций мозга. С учётом этого необходимо планирование экспериментов на ускорителях заряженных частиц не только с мелкими лабораторными животными, но и с приматами. Первые шаги в этом направлении были предприняты ЛРБ в 2013 г., когда на медицинском пучке фазотрона ЛЯП с энергией 170 МэВ и на пучке ядер углерода Нуклотрона ЛФВЭ с энергией 500 МэВ на нуклон были облучены по три макаки-резус, предоставленные ИМБП. Область головы (мозг) обезьян облучалась до получения дозы 1 Гр. Животные были предварительно обучены решению тестовых задач на компьютере. Целью опытов было выявление нарушений приобретённых животными навыков в результате воздействия на мозг тяжёлых заряженных частиц со сравнительно небольшими значениями ЛПЭ. После облучения обезьяны были возвращены в ИМБП для продолжения исследований.

Предстоит большая дальнейшая экспериментальная работа на ускорителях, поскольку возникает ещё очень много вопросов.

## 5. Заключение

Ускорительные установки, сосредоточенные в ОИЯИ, предоставляют широкие возможности для проведения

многоплановых радиобиологических исследований, касающихся как фундаментальных проблем радиационной генетики, молекулярной радиобиологии, радиационной физиологии, так и решения широкого круга практических вопросов. Прежде всего, это решение задач, стоящих перед космической радиобиологией (особенно для пилотируемых полётов в дальний космос), применение ускоренных заряженных частиц в терапии злокачественных опухолей. Исследования биологической эффективности протонов и многозарядных ионов (главным образом, углерода) представляются особенно актуальными в связи с активным внедрением в клиническую практику ускорителей радиационного назначения. Очевидно, что детальные радиобиологические исследования на пучках ускорителей такого рода совершенно необходимы, и накопленный в ОИЯИ богатый материал в данной области является весьма востребованным.

## Список литературы

1. Григорьев Ю Г (Ред.) *Биологическое действие протонов высоких энергий (к оценке радиационной опасности космических полетов)* (М.: Атомиздат, 1967)
2. Красавин Е А *Проблема ОБЭ и репарация ДНК* (М.: Энергоатомиздат, 1989)
3. Красавин Е А, Козубек С *Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ* (М.: Энергоатомиздат, 1991)
4. Борейко А В, Красавин Е А *ЭЧАЯ* **42** 1865 (2011); Boreyko A V, Krasavin E A *Phys. Part. Nucl.* **42** 998 (2011)
5. Belov O V, Krasavin E A, Parkhomenko A Y *J. Theor. Biol.* **261** 388 (2009)
6. Bugay A N et al. *J. Theor. Biol.* **364** 7 (2015)
7. Govorun R D et al. *Adv. Space Res.* **30** 885 (2002)
8. Красавин Е А и др. *ЭЧАЯ* **35** 1483 (2004); Krasavin E A *Phys. Part. Nucl.* **35** 797 (2004)
9. Falk M et al. *J. Radiat. Res.* **55** (Suppl. 1) i81 (2014)
10. Baranova E V et al., in *Rapid Diagnosis in Populations at Risk from Radiation and Chemicals, Proc. of the NATO Advanced Training Course on Rapid Diagnosis in Population at Emergency and Risk, Krakow-Zakopane, Poland, 19–24 October 2009* (NATO Science for Peace and Security Series. E, Vol. 73, Eds A Cebulka-Wasilewska, A N Osipov, F Darroudi) (Washington, D.C.: IOS Press 2010) p. 261
11. Григорьев А И, Красавин Е А, Островский М А *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова* **99** 273 (2013)
12. Тронов В А и др. *Цитология* **54** 261 (2012); Tronov V A et al. *Cell Tissue Biol.* **6** 219 (2012)
13. Штемберг А С и др. *Нейрохимия* **32** 78 (2015); Shtemberg A S et al. *Neurochem. J.* **9** 66 (2015)

### Radiobiological research at JINR's accelerators

E.A. Krasavin. Joint Institute for Nuclear Research, Laboratory of Radiation Biology, ul. Joliot-Curie 6, 141980 Dubna, Moscow region, Russian Federation  
Tel. +7 (496) 216 57 40. Fax +7 (496) 216 59 48  
E-mail: krasavin@jinr.ru

The half-a-century development of radiobiological studies at the Joint Institute for Nuclear Research (JINR) is reviewed on a stage-by-stage basis. With the use of the Institute's accelerators, some key aspects of radiation biology have been settled, including the relative biological effectiveness (RBE) of radiations with different physical characteristics; the radiation-induced mutagenesis mechanisms; and the formation and repair of genetic structure damage. Practical space radiobiology problems that can be solved using high-energy charged particles are discussed.

**Keywords:** radiobiology, space radiobiology, the problem of the relative biological effectiveness, radiation-induced mutagenesis, repair damage, ionizing radiation

PACS numbers: **87.53**, –j, **87.56**. –v  
Bibliography — 13 references  
*Uspekhi Fizicheskikh Nauk* **186** (4) 435–443 (2016)

DOI: 10.3367/UFN.0186.201604e.0435  
Received 6 July 2015  
*Physics – Uspekhi* **59** (4) (2016)