

Было установлено, что дозовая зависимость частоты мутирования клеток при гамма-облучении имеет линейно-квадратичный характер, который не меняется с ростом ЛПЭ; относительная генетическая эффективность излучений возрастает с увеличением ЛПЭ и описывается кривой с локальным максимумом. Положение максимума этой зависимости сдвинуто в область меньших ЛПЭ по сравнению с аналогичной зависимостью для летальных эффектов облучения; мутагенез, индуцированный излучениями с разной ЛПЭ, зависит от эффективности систем репарации клеток. Решающая роль в нем принадлежит индуцибельной SOS репарации; повышение генетической эффективности излучений с ростом ЛПЭ обусловлено увеличением выхода поврежденных ДНК, репарируемых лишь с участием мутагенной ветви SOS репарации; генные мутации у прокариот при прохождении треков тяжелых заряженных частиц индуцируются областью δ -электронов; различия в положении максимумов зависимости относительной биологической эффективности от ЛПЭ для мутагенных и летальных эффектов облучения обусловлены разным характером повреждений ДНК. В первом случае ими являются преимущественно поврежденные основания, во втором — двуниевые разрывы; биологическая эффективность излучений с различной ЛПЭ по индукции генных мутаций определяется особенностями микрораспределения энергии в генетических структурах, состоянием генома и эффективностью систем репарации. Влияние биологического фактора на мутагенез является зависимым от ЛПЭ¹.

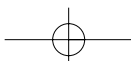
Цикл исследований механизмов мутагенного действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки с разным уровнем организации генетического аппарата был удостоен первой премии ОИЯИ.

3. Становление отдела биофизики ЛЯП

Расширение спектра исследований в области радиобиологии на базовых установках ОИЯИ требовало структурной реорганизации подразделения, осуществляющего эти исследования. В 1988 году сектор биологических исследований был преобразован в Отдел биофизики ЛЯП (приказ по ОИЯИ от 25.03.1988 г. № 248). Одним из приоритетных направлений работы отдела биофизики в этот период явилось изучение мутагенного действия излучений на клетки высших эукариотов, в том числе человека. Как было выяснено, ионизирующая радиация индуцирует наиболее широкий спектр мутационной изменчивости по сравнению с другими мутагенами. Она увеличивает частоту хромосомных aberrаций, генных и геномных мутаций. Наименее изучено мутагенное действие излучений на клетки высших эукариотов, в том числе человека. Хотя это явление было обнаружено еще в середине 20-х годов XX века, оно до сих пор остается слабоизученным. И, прежде всего, это касается мутагенного действия разных видов ионизирующих излучений с высокой ЛПЭ, в частности ускоренных тяжелых ионов.

Индукцированный мутагенез представляет реальную опасность для жизни и здоровья человека, поскольку вновь возникающие мутации оказывают не только непосредственное негативное влияние, но влияют и на последующие поколения. Мутаге-

¹ Красавин Е.А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат. 1991. С. 183.



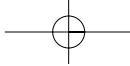
ны физической и химической природы индуцируют широкий спектр различных наследуемых повреждений, которые, по общепризнанному мнению, лежат в основе злокачественного перерождения клеток и канцерогенеза, а также возникновения в последующих поколениях наследственных заболеваний. Причем в обоих случаях биологические последствия существенно отдалены по времени от момента непосредственного действия вызывающих их повреждающих агентов.

Задача изучения мутагенного действия ионизирующих излучений, особенно на клетки млекопитающих и человека, весьма сложна и требует широкого использования как уже разработанных методов, так и создания и развития новых подходов для ее решения. К настоящему времени в распоряжении цитогенетиков имеется ряд таких методов и тест-систем (ПЦР, ПКХ, блот-анализ, FISH-техника, ряд методов анализа хромосомных нарушений), позволяющих проводить исследования по выяснению механизмов и основных закономерностей радиационного мутагенеза клеток человека и млекопитающих.

Ускорители ОИЯИ предоставляют уникальные возможности для проведения исследований в этом направлении. На пучках разных видов заряженных частиц широкого спектра энергий и ЛПЭ в отделе биофизики в тот период начали осуществляться эксперименты на культурах клеток млекопитающих и лимфоцитах периферической крови человека. Они позволили установить основные закономерности образования разных видов так называемых нестабильных хромосомных aberrаций (дицентрики и кольца, некоторые виды обменов между хромосомами), выявляемых общепринятым, ставшим классическим метафазным методом анализа хромосом. Количественный анализ дицентриков используется для целей биологической дозиметрии при случайных неконтролируемых облучениях человека. Этот метод анализа также рекомендован ВОЗ для оценки состояния окружающей среды. Однако возможность оценки поглощенной дозы при этом ограничивается острым периодом после лучевого воздействия, поскольку хромосомные aberrации приводят к нарушению процессов клеточного деления и быстро элиминируются из популяции облученных клеток.

Долгое время не удавалось обнаруживать так называемые стабильные хромосомные aberrации (такие, как транслокации), которые способны длительно сохраняться в популяции облученных клеток, перенося искаженную генетическую информацию от одного поколения клеток к другому. Только разработанный в последние десятилетия метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH-техника) позволил выявлять такие стабильные aberrации при использовании ДНК-проб, специфичных для отдельных хромосом генома человека. Проведенные эксперименты на ускорителях протонов и тяжелых ионов с использованием этого метода позволили количественно проанализировать частоту образования транслокаций некоторых хромосом в зависимости от дозы и величины ЛПЭ излучений (протоны, ионы азота, γ -лучи). В настоящее время с образованием стабильных aberrаций хромосом связывают инициацию ряда онкологических заболеваний, таких как, например, хроническая и острая миелоидные лейкемии. Количественный учет стабильных хромосомных aberrаций в клетках организма может рассматриваться и как один из надежных методов ретроспективной биологической дозиметрии при случайных неконтролируемых облучениях организма¹.

¹ Репин М.В., Говорун Р.Д., Красавин Е.А. // Физика элементарных частиц и атомного ядра (ЭЧАЯ). 2002. Т. 47, вып. 36. С. 746–766.



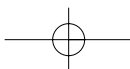
В отделе биофизики были проведены сравнительные исследования закономерностей индукции мутаций одного из генов (HPRT) в клетках млекопитающих в зависимости от величины инициирующей дозы излучений, в том числе тяжелых ионов, в широком диапазоне значений их ЛПЭ. Облучение клеток тяжелыми ионами и γ -квантами выявило высокое мутагенное действие этих видов излучений на клетки млекопитающих.

В этот период был выполнен большой объем радиобиологических предклинических исследований на медицинских пучках синхротронного ускорителя ЛЯП. Для этих целей необходимо было оценить биологическое действие заряженных частиц на нормальные и опухолевые клетки млекопитающих. Такого рода исследования можно было провести на животных с прививаемыми опухолями. Существует большое количество различных линий опухолей, которые можно прививать экспериментальным животным и изучать их реакцию на облучение, при этом оценивать степень повреждения нормальных тканей, например костного мозга, являющегося критической радиочувствительной системой при лучевой терапии. Такого рода эксперименты были осуществлены в первую очередь.

Однако дать точную количественную оценку основных параметров биологического действия частиц — относительной биологической эффективности и коэффициента кислородного усиления (ККУ) в экспериментах *in vivo* на целостном организме оказалось невозможно: сильно сказывалась индивидуальная радиочувствительность клеток и влияние организма в целом на реакцию опухоли. В связи с этим встала задача изучения основных биологических параметров медицинских пучков на клетках изолированных из организма и растущих *in vitro* на искусственных питательных средах — то есть на культуре клеток. Эта работа требовала сооружения специальных помещений, боксов, обеспечивающих стерильность, так как возможность бактериального заражения клеток очень велика.

В качестве основных количественных показателей при оценке биологического действия излучения использовали клоногенную способность клеток и повреждение хромосомного аппарата. ОБЭ протонов и π^- -мезонов в пике Брегга и на входе пучка оценивали по сравнению с действием стандартных, широко применяемых в лучевой терапии γ - и рентгеновского излучений.

Одной из главных проблем при проведении лучевого лечения является преодоление радиорезистентности гипоксических клеток, которые, как правило, присутствуют в опухоли из-за слабого развития сосудистой сети новообразований. При действии редкоионизирующих излучений, γ - и рентгеновских лучей, протонов различие в радиочувствительности оксигенированных и аноксических клеток весьма велико и ККУ составляет 3. При действии излучений с высокой ЛПЭ величина ККУ снижается. В литературе к тому времени отсутствовали данные о ККУ для π^- -мезонов. Надо заметить, что определение этой очень важной для лучевой терапии величины требует значительных технических ухищрений. Необходимо сравнить радиочувствительность оксигенированных и аноксических клеток, в которых содержание кислорода не должно превысить 20–30 частей на миллион. Для этого была сконструирована специальная аппаратура для откачивания газовой смеси из сосудов, содержащих клеточные суспензии, и последующего заполнения их азотом. И хотя эта процедура осуществлялась многократно, получить ККУ=3 при γ -облучении не удавалось. Только

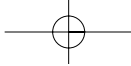




Радиобиологи работают в стерильных боксах с перевиваемыми культурами клеток человека

заменяя применяемый нами «сверхчистый» азот на аргон и усилив метаболическое потребление кислорода из среды путем создания высокой концентрации клеток, удалось достигнуть нужной величины – 3 для γ -излучения и определить ККУ для π^- -мезонов – ККУ для этих частиц оказался равным 1,7. Эти работы выполнены впервые в мире и в последующем наши данные были подтверждены американскими исследователями.

Параллельно с этими исследованиями интенсивно велись работы по использованию искусственной гипергликемии (ГГ) для повышения эффективности лучевой терапии опухолей. Известно, что метаболизм опухолевых клеток отличается от нормальных повышенной способностью к гликолизу, продуктом которого является молочная кислота, накопление которой приводит к самокислению опухолей. В исследованиях на животных с привитыми опухолями и на больных с запущенными формами рака немецким исследователем Арденне и сотрудниками Белорусского онкологического института было показано, что в условиях искусственного повышения содержания сахара в крови значительно возрастает эффективность лучевого лечения. Общепринято было считать, что это связано с подавлением пострадиационного восстановления в условиях сниженного рН. Однако серьезная экспериментальная база, необходимая для клинического применения метода и стабильного воспроизведения результатов, отсутствовала.

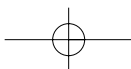


Целью проводимых исследований в отделе биофизики являлось изучение клеточных механизмов ГГ. Эксперименты проводили в системе *in vitro* на опухолевых клетках, взятых у животных непосредственно перед опытом. Это позволяло, создавая дозированную глюкозную нагрузку и меняя уровень оксигенации, контролировать степень закисления и выживаемость опухолевых клеток. В ходе экспериментов были получены весьма неординарные результаты. Было показано, что при достижении определенной степени закисления, имеющей место в условиях гипоксии, опухолевые клетки подвергаются массовой гибели без всякого дополнительного воздействия, в частности облучения. Наши количественные оценки свидетельствовали о том, что имеет место аддитивность (суммация) двух воздействий: гипоксические клетки погибают в результате самозакисления, хорошо оксигенированные, слабо гликолизирующие – в результате воздействия излучения. Влияние ГГ на пострадиационное восстановление не было обнаружено. Полученные нами результаты подтверждены в ряде специализированных онкологических лабораторий. Применение сосудосуживающих препаратов, дополнительно повышающих гипоксию в опухолях и усиливающее гликолиз, двукратно повышало эффективность лечения. К сожалению, эти исследования не получили дальнейшего развития, так как в результате событий начала девяностых годов распались научные коллективы, занимающиеся этими проблемами.

Наряду с радиобиологическими исследованиями на клетках высших организмов в отделе биофизики проводились многоплановые работы с клетками низших эукариотов – клетками дрожжей. Этот организм, относящийся к грибам, является одним из любимых объектов изучения живых систем. На протяжении всей истории человек сталкивался с негативным действием разнообразных болезнетворных организмов, однако именно дрожжи были, по-видимому, первыми микроорганизмами, которые человек стал использовать для удовлетворения своих потребностей.

Хорошо известно, что одним из важных факторов, определяющих особенности реакции дрожжевых клеток на облучение, является их пloidность. Диплоидные клетки отличаются от гаплоидных величиной радиочувствительности, формой кривой выживания, ОБЭ, проявлением мутаций, повышающих чувствительность к ионизирующим излучениям. Попытки интерпретации этих закономерностей привели к предположению о существовании у диплоидных клеток так называемой диплоидспецифической репарации повреждений. Эта проблема имеет важный общебиологический аспект. Переход от гаплоидных организмов к диплоидным в процессе эволюции привел к существенному повышению надежности генетического аппарата к различным повреждающим воздействиям внешней среды.

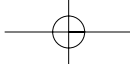
В отделе биофизики были проведены исследования по изучению роли факторов, обусловленных диплоидным состоянием генома, в чувствительности дрожжевых клеток с разным генотипом к действию ионизирующих излучений, различающихся по ЛПЭ. Было показано, что закономерности летального действия ионизирующих излучений разного качества на диплоидные клетки дрожжей обусловлены, по крайней мере, двумя диплоидспецифическими процессами: репарацией повреждений, лежащей в основе пострадиационного восстановления клеток, и процессами, определяющими «эффект дорастания». Проведенные исследования позволили сделать вывод о взаимной независимости механизмов репарации в процессе реализации радиационных повреждений. Впервые осуществлена оценка роли диплоидспецифической репа-



рации в радиочувствительности клеток при действии излучений с высокой ЛПЭ и изучена зависимость эффективности репарационных процессов от качества излучения. Показано, что сигмоидная форма кривой выживания диплоидных клеток при действии излучений с высокой ЛПЭ обусловлена исключительно «эффектом дорастания».

В дальнейшем были продолжены работы по изучению мутагенного эффекта ионизирующей радиации на клетках дрожжей. Проблема состояла в том, что определить природу мутационного повреждения довольно трудно. В процессе работы удалось подобрать такие генетические системы, которые позволяли определить точную природу мутационного события без использования дорогостоящих и трудоемких методик. В качестве модельной системы для изучения тотального мутагенеза использовали ген *CAN1*, кодирующий аргининпермиазу и имеющий протяженность 1,8 тысяч пар оснований. Мутации любой природы приводят к нарушению функции гена и возникновению резистентности к антибиотику. Для тестирования крупных перестроек использовали две тест-системы, позволяющие определять митотический кроссинговер и конверсию. Митотическую рекомбинацию, как известно, индуцируют двуниевые разрывы. В результате рекомбинации образуются протяженные изменения генетического материала.

Для анализа микроделаций использовали возникновение реверсий у штаммов, имеющих мутации сдвига рамки считывания. Используемый в работе штамм несет вставку 4 основания в гене *LYS2* и вставку +1Т в последовательность 6Т в гене *НОМ3*. Реверсии к фенотипу дикого типа *Lys⁺* и *Ном⁺* по преимуществу представляют собой выпадение одного нуклеотида. Для оценки индукции точечных мутаций замен пар нуклеотидов использовали тестерную систему, разработанную профессором Хэмпси (Университет Луизианы). В этой системе используется то обстоятельство, что положение 22 цистеина в белке *изо*-цитохром-с является критическим. Сконструированы 6 штаммов, имеющих в этом положении замены пар оснований, что приводит к инактивации фермента и неспособности роста на среде с несбраживаемым источником углерода. Восстановление функциональной активности возможно только за счет истинных реверсий, восстанавливающих кодон цистеина в положении 22. Реверсии в *СУС1* гене каждого из шести штаммов представляют собой один из шести возможных замен пар оснований. Таким образом была получена простая и надежная система, позволяющая определять происходящие в клетке изменения нуклеотидной последовательности ДНК без использования сложных молекулярных и генетических методик. В экспериментах с данной системой наиболее подробно изучен спектр мутаций под действием γ -облучения. Ионизирующей радиацией наиболее эффективно индуцируются крупные перестройки, частота которых характеризуется величинами порядка одного процента. Кривая индукции рекомбинационных событий выходит на плато. Из непротяженных мутационных событий наиболее эффективно индуцируются мутации в гене *CAN1*, что отражает суммарный характер мутаций. Получена линейная кривая зависимости образования прямых мутаций в гене *CAN1* от дозы при γ -облучении. Показано, что γ -лучи эффективно индуцируют мутации сдвига рамки считывания. Для сравнения приведены частоты индуцированного мутагенеза: частота прямых мутаций резистентности к канаванину (*CANr*) составляет $5,8 \cdot 10^{-5}$; мутации сдвига рамки считывания для реверсий к *Lys⁺* – $1 \cdot 10^{-6}$ и реверсий к *Ном⁺* –



$1,6 \cdot 10^{-7}$ при дозе облучения 100 Гр. В пределах изученных доз (100–1000 Гр) зависимость частоты мутаций сдвига рамки считывания от дозы имеет линейный характер. Однако анализ индукции точечных мутаций выявил линейный характер кривых для гаплоидов и линейно-квадратичный характер кривых для диплоидных штаммов. Анализ спектра мутаций показал, что спектр мутаций, индуцированных γ -излучением, отличается от спектра спонтанных мутаций повышенной долей трансверсий АТ-ТА. Спектр замен пар оснований совпадает у гаплоидных и диплоидных штаммов дрожжей. Максимальный вклад (более 30%) приходится на долю транзиций GC-AT. Спектр индуцированных мутаций не зависит от дозы облучения.

Другим направлением исследований являлось изучение механизмов репарации двунитевых повреждений, индуцированных радиацией. Было выяснено, что у дрожжевых клеток существует не только медленный тип репарации двунитевых разрывов ДНК, но также и быстрый тип репарации таких повреждений. При этом было показано, что и медленный тип репарации двунитевых разрывов, и быстрый тип репарации таких повреждений эффективно осуществляется только у диплоидных дрожжевых клеток.

Третьим направлением исследований являлось изучение закономерностей спонтанного мутагенеза. Для исследований были выбраны гены, контролирующие синтез аденина и лейцина. Исходные штаммы ауксотрофны и не способны расти на среде без добавки соответствующего продукта. Реверсии к прототрофности могут происходить двумя путями: путем образования обратных мутаций в гене, контролирующем его синтез, и путем прямых мутаций в генах-супрессорах. В специальных опытах было установлено, что в условиях, при которых активность гена подавлена, этот ген образует мутации с частотами, на два порядка меньшими, чем в условиях, когда он активно работает. В то же время гены-супрессоры, активность работы которых не зависит от наличия в среде аденина, в обоих случаях мутируют примерно с одинаковыми частотами.

Таким образом в отделе биофизики были проведены многоплановые радиобиологические исследования на базовых установках ОИЯИ. После успешного проведения работ по ускорению тяжелых ядер до релятивистских энергий на синхрофазотроне Лаборатории высоких энергий и начала физических экспериментов на новом ускорителе этой лаборатории были спланированы радиобиологические эксперименты на пучках высокоэнергетичных тяжелых ионов. Проведение таких работ требовало специальных спектрометрических и дозиметрических исследований пучков релятивистских тяжелых ядер. Большим опытом в данной области обладали сотрудники Отдела радиационных исследований и радиационной безопасности ОИЯИ. Дирекция ОИЯИ (В.Г.Кадышевский и А.Н.Сисакян) поддержали инициативу объединения Отдела биофизики ЛЯП и Отдела радиационных исследований и радиационной безопасности ОИЯИ в новое структурное подразделение Института – Отделение радиационных и радиобиологических исследований (приказ по ОИЯИ от 27.04.1995 г. № 270).

4. Отделение радиационных и радиобиологических исследований (ОРРИ)

Основными задачами созданного Отделения являлось проведение радиационных и радиобиологических исследований в следующих главных направлениях:

