

МИШЕННЫЕ И НЕМИШЕННЫЕ РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ – ИХ ПОРОГОВОСТЬ И БЕСПОРОГОВОСТЬ

Н. М. Рашидов, Н. К. Куцоконь

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

Теория мишени основана на трех принципах: попадание в чувствительный объем, поражение мишени и усиление первичных повреждений ионизирующего излучения на клетку. Простота полученной из теории мишени формулы объединяет уровень повреждения в зависимости от дозы облучения с параметрическим определением числа и объема мишени. Это обстоятельство на продолжительное время сделало теорию мишени эвристическим методом получения новых знаний как в радиобиологии, так и в биологии вообще. Повреждения можно разделить на две части: необратимые и обратимые. К необратимым относят гибель клеток, апоптоз и некроз. К обратимым – морфологические изменения выживших клеток, радиационный ответ плазматической мембраны и органелл. К ускорителям радиационных повреждений можно отнести не только известные клеточные метаболические процессы, которые приводят в конечном итоге к усилению повреждения, но и существование в клетках специальных механизмов ответа клетки на различные стрессовые факторы, включая антропогенные. К таким клеточным механизмам можно отнести кроссинговер, синтез шаперонов и присутствие в системе виридов.

На заре развития радиобиологии были накоплены экспериментальные данные, которые хорошо описываются экспоненциальной зависимостью эффекта от дозы, что послужило толчком для создания количественной теории мишени. Теория мишени основана на трех принципах: попадание в чувствительный объем, поражение мишени и усиление первичных повреждений действия ионизирующего излучения на клетку. В смысл «попадания и мишени» вкладываются такие аксиоматичные истины: а) при действии ионизирующих излучений энергия передается дискретно со статистическими свойствами распределения актов передачи; б) молекулы или субклеточные структуры, которые повреждаются, имеют важное значение для жизнедеятельности и являются уникальными или универсальными для клетки; в) неадекватно малая передача энергии, приводящая к существенным биологическим изменениям, может проявляться в том случае, если принять идею о существовании усилителя в клетке. Перекисное окисление липидов считается одним из классических механизмов усиления повреждения в клетках облученных организмов [1].

Простота выводов, полученных из теории мишени, позволяет в одной формуле $\ln \eta = \ln n - vD$ объединить уровень повреждения η в зависимости от дозы облучения D при параметрическом определении из графика числа n и объема мишени v . Это на продолжительное время сделало теорию мишени эвристическим методом получения новых знаний как в радиобиологии, так и в биологии вообще. Теория мишени, по мнению Дж. Ли [2], применима не только для параметров выживания клетки, но и для определения инактивации ферментов и вирусов, а также изучения индукции хромосомных aberrаций. Помимо кривых «доза - эффект» с экспоненциальным характером встречаются кривые, которые описываются линейно-квадратичным уравнением, а также уравнениями других типов. Типичное поведение кривых распределения мембранных биопотенциалов показано на рис. 1.

Как видно из рис. 1, кривые хорошо описываются пуассоновым распределением, в связи с чем была произведена их аппроксимация к уравнению Пуассона (таблица).

$$Y = (f / \sqrt{2\pi\sigma}) \cdot \exp\left[-(x - a)^2 / 2\sigma^2\right], \quad Y_{\max} = f / \sqrt{2\pi\sigma},$$

где Y - вероятность распределения мембранных потенциалов; x - значение биопотенциала мембран клеток (E_m), мВ; a - среднее значение E_m или центр тяжести распределения; f - нормирующий множитель; σ - дисперсия распределения.

Как видно из таблицы, среднее значение мембранного потенциала в зависимости от дозы смещается к более низким значениям. Варианты, в которых семена облучали тепловыми нейтронами, достоверно отличаются от вариантов, в которых семена облучали γ -лучами как по значению дисперсии распределения, так и по Y_{\max} . Чем выше повреждение или тяжесть повреждения (за счет компаунд-ядер бора, азота и т.д.), тем более сужается распределение и уменьшается дисперсия распределения, и вероятность пика распределения существенно увеличивается, хотя среднее значение E_m облученных клеток приблизительно равно для всех вариантов.

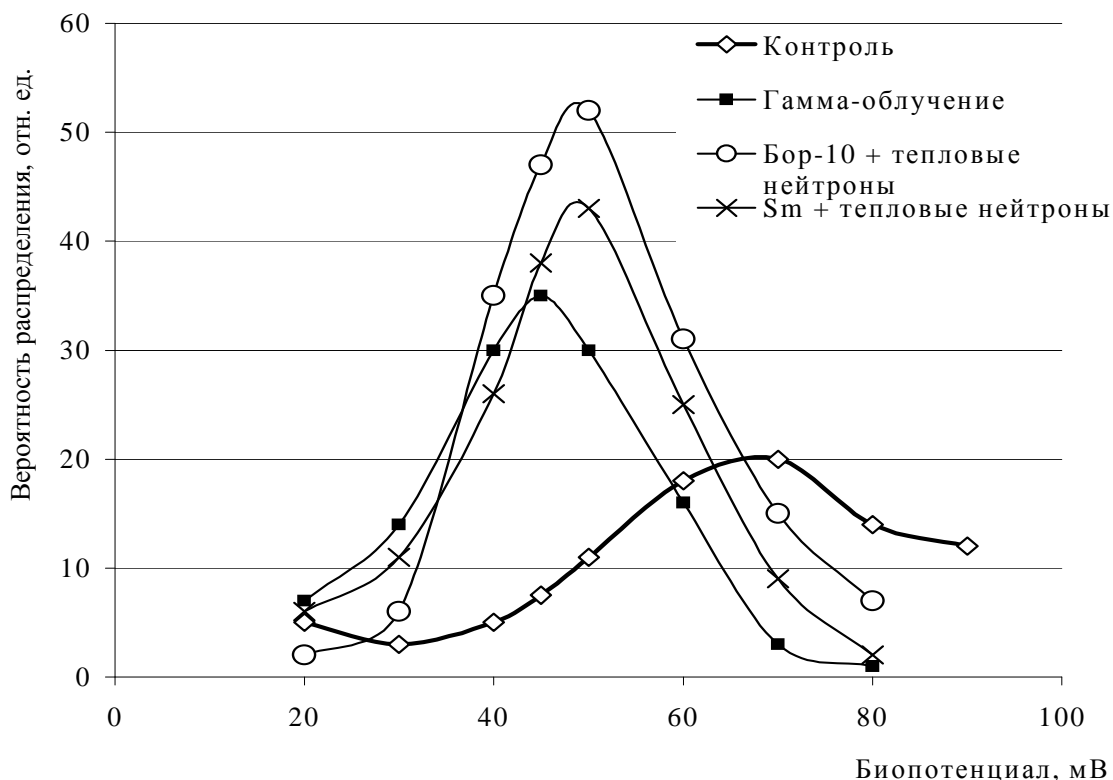


Рис. 1. Кривые распределения мембранных биопотенциалов у эпидермальных клеток корней гороха, облученных тепловыми нейтронами и γ -излучением.

Параметры кривых распределения мембранного потенциала для необлученных и облученных семян гороха

Обработка семян	Среднее значение E_m	Дисперсия распределения σ	Нормирующий множитель f	Вероятность распределения Y_{\max}	t при P_{05}
Контроль (без облучения)	$-71,89 \pm 2,47$	$21,76 \pm 2,59$	$223,58 \pm 17,55$	19,20	-
γ -облучение семян, 300 Гр					
Контроль	$-43,09 \pm 1,13$	$12,73 \pm 1,13$	$286,35 \pm 17,55$	31,10	5,1
^{10}B	$-44,01 \pm 1,10$	$12,58 \pm 2,11$	$281,45 \pm 19,17$	31,70	4,9
Sm	$-43,58 \pm 1,32$	$13,07 \pm 1,93$	$285,24 \pm 17,93$	31,00	5,2
Облучение семян тепловыми нейтронами (флюээнс $5 \cdot 10^{12}$ нейтр./см ²)					
Контроль	$-43,58 \pm 1,32$	$6,54 \pm 0,45$	$385,26 \pm 9,34$	59,60	4,6
^{10}B	$-43,58 \pm 1,32$	$7,77 \pm 1,13$	$322,95 \pm 32,04$	46,22	4,8
Sm	$-43,58 \pm 1,32$	$6,58 \pm 0,21$	$394,31 \pm 7,42$	61,32	4,7

На примере передачи генетических повреждений из M_1 в M_2 поколение у ячменя видно, что если в M_1 выживаемость проростков ячменя описывается экспоненциальной кривой, то в M_2 выход хлорофильных мутаций можно описывать линейно-квадратичной зависимостью [3 - 5] (рис. 2). При максимальном значении дозы повреждения в M_1 у ^{10}B обогатенных и облученных тепловыми нейтронами вариантах выход хлорофильных мутаций в M_2 увеличивается до 20 %. В случае γ -облучения выход хлорофильных мутаций в M_2 не превышал 12 %, т.е. закономерности передачи мутаций из поколения в поколение не нарушаются, происходят только количественные изменения [5, 6].

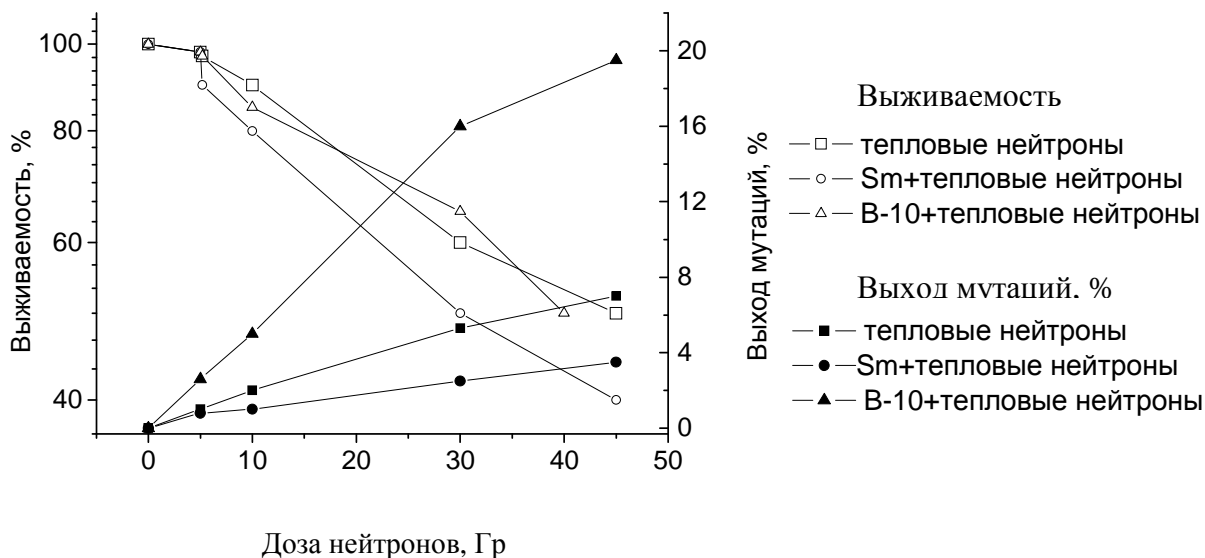


Рис. 2. Выживаемость проростков ячменя в M_1 и выход хлорофильных мутаций в M_2 под влиянием тепловых нейтронов.

Особенно четкое несоответствие распределения хромосомных повреждений показано при исследовании выхода множественных повреждений в клетках лука *Allium cepa* L. (рис. 3). Как видно из рисунка, при увеличении дозы облучения значительно увеличивается выход мультиабберрантных клеток [7], хотя по теоретическим расчетам нарастание нагруженности клеток абберрациями должно происходить постепенно, за счет увеличения числа клеток с одной и двумя абберрациями. В нашей предыдущей работе мы провели сравнение эмпирических поклеточных распределений хромосомных абберраций с теоретическими распределениями (распределения Пуассона, геометрическое и отрицательное биномиальное) и установили, что эмпирическое распределение не соответствует вышеперечисленным распределениям адекватно [8].

При изучении выхода хлорофильных мутаций обнаруживаются два возможных пути проявления повреждений - усиление эффекта и его элиминация за счет гаплонтного отбора при мейозе, в то время как при соматических мутациях тоже имеется возможность проявления повреждений усилением эффекта, но по механизму диплонтного отбора при помощи индукции митотического кроссинговера. Применяя тест-систему волосков тычиночных нитей традесканции, мы исключаем гаплонтный отбор традесканции и на первый план выходит диплонтный отбор.

Растения традесканции клона 02 выращивали в течение трех периодов цветения на почвах с различными уровнями загрязнения радионуклидами. Контрольную почву отбирали в районе Киева, опытную – в окрестности Чернобыля и в с. Копачи. Рассчитывали теоретически накопленную дозу в течение одного, двух и трех посадок при соматическом размножении растений. Из данных, приведенных на рис. 4 и 5 видно, что частота рецессивных мутаций у растений, выросших в загрязненном грунте, повышена так же, как и частота

растений с морфозами. Однако результаты показывают, что происходит адаптация растений к повышенным уровням загрязнения почвы, и потому рассуждать о дозовых зависимостях при малых дозах в этом случае неправомерно [9]. Выращивание традесканции в загрязненной радионуклидами почве приводит к внеплановому митотическому кроссинговеру в соматических клетках, что ведет к повышению частоты рецессивных мутаций.

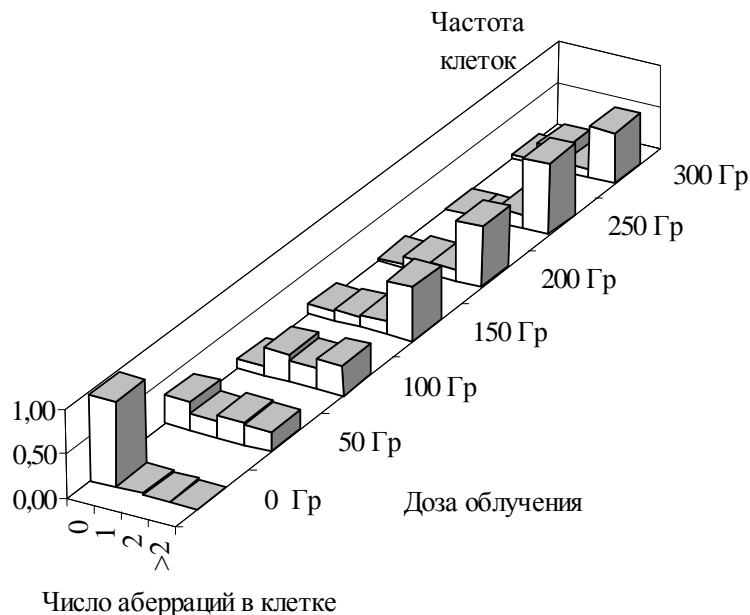


Рис. 3. Влияние γ -излучения на поклеточное распределение aberrаций в клетках *Allium cepa* L.

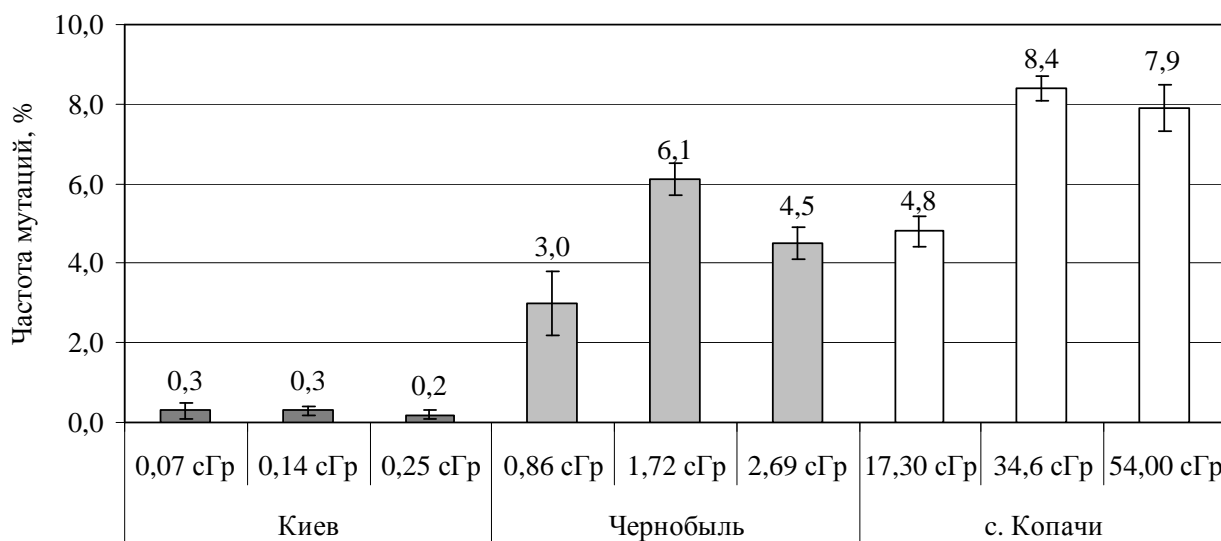


Рис. 4. Частота рецессивных мутаций в волосках тычиночных нитей у растений *Tradescantia* клона 02, выращенных в грунте с различными уровнями загрязнения радионуклидами. Доза рассчитана теоретически для материнских растений в течение трех посадок.

Подобные факты мы также наблюдали для трансгенных линий *Arabidopsis thaliana*, у которых изменения генома оценивали с помощью сигнального GUS-гена, который проявляется при рекомбинации ДНК [10]. Наличие данного гена вызывает появление синих пятен

у различных трансгенных линий растений арабидопсиса, и может проявляться как в вегетативных, так и в генеративных органах (рис. 6).

Полученные данные свидетельствуют о том, что возрастание нестабильности генома вследствие накопления различных типов повреждений приводит, в конечном итоге, к индукции внепланового митотического кроссинговера. Таким образом, эти процессы играют роль усиления повреждающего действия излучения на мишень [5].

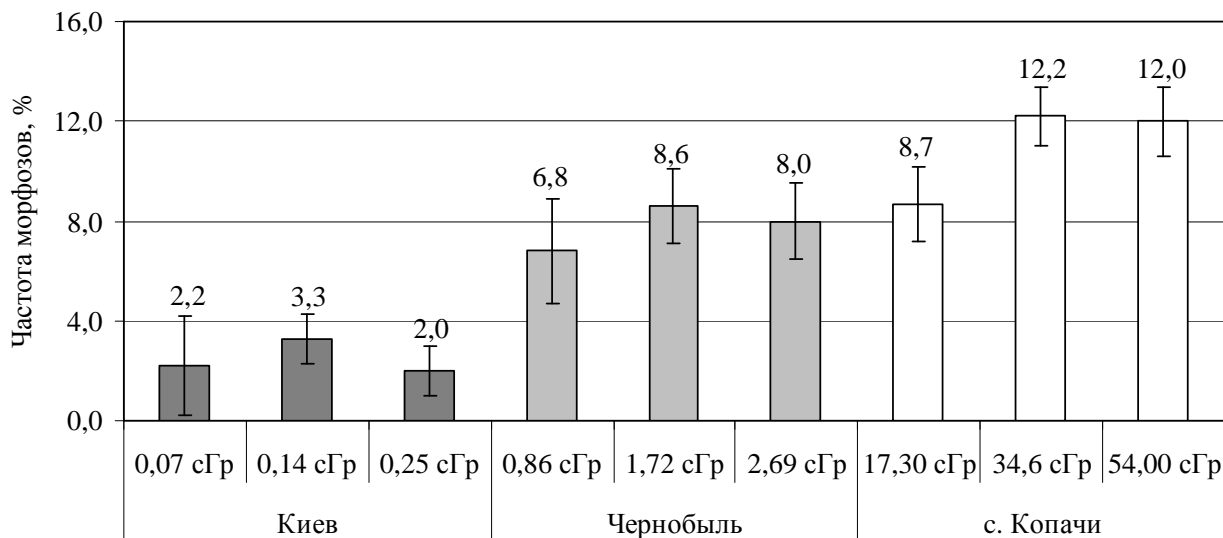


Рис. 5. Частота морфозов у растений *Tradescantia* клона 02, выращенных в грунте с различными уровнями загрязнения радионуклидами. Доза рассчитана теоретически для материнских растений в течение трех посадок.

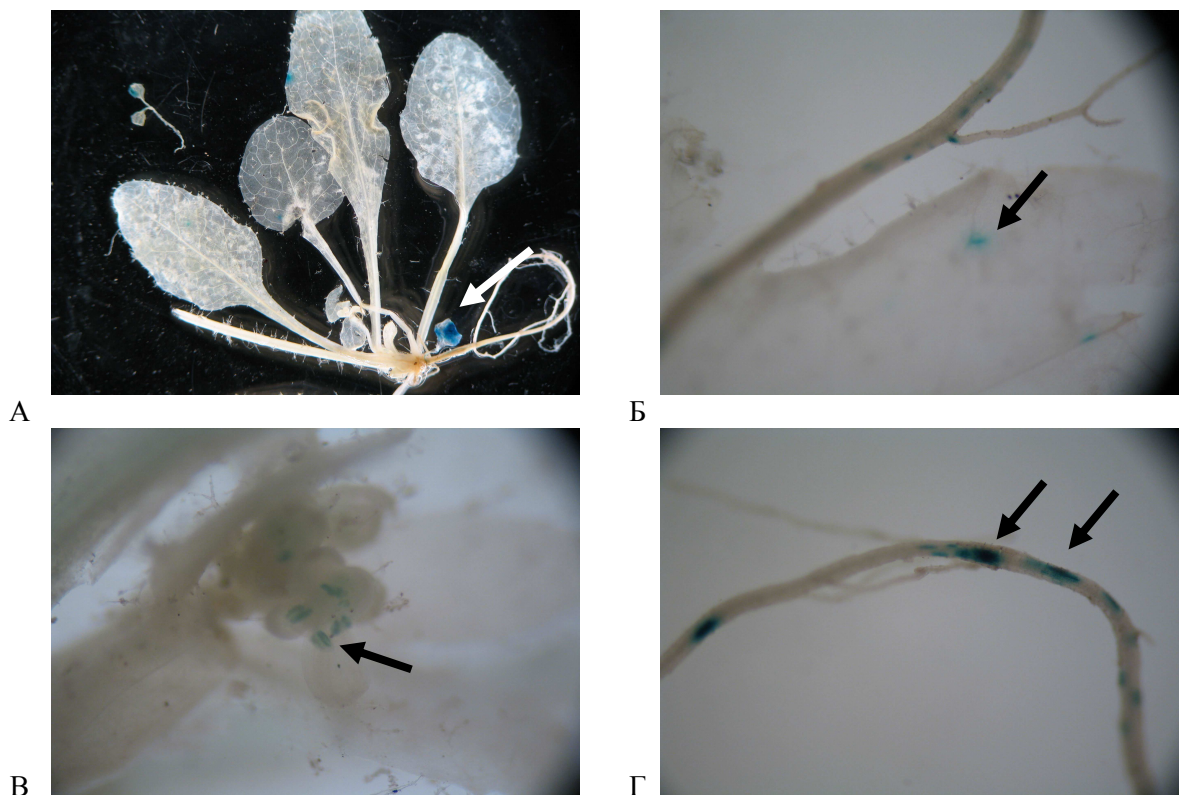


Рис. 6. Рекомбинантные явления по гену β -глюкуронидазы у трансгенных линий растений *Arabidopsis thaliana* на листьях (А, Б), генеративных органах (В) и корнях (Г).

Условно радиационные повреждения в клетке можно разделить на две части: необратимые и обратимые. К необратимым можно отнести гибель клеток, апоптоз и некроз, а к обратимым - морфологические изменения клеток в проявлении выживаемости, радиационный ответ плазматической мембраны и органелл, которые включают изменения мембранно-связанных кальциевых каналов, мембранных доменов, микроморфологии клеточных поверхностей, межклеточных контактов, цитоскелета, изменения структуры митохондрий и хлоропластов, эндоплазматического ретикулула, аппарата Гольджи, лизосом. Кроме того, к обратимым повреждениям можно отнести хромосомные aberrации и микроядра, как следствие последних, выпуклость ядер, изменение в упаковке ДНК [11].

К ускорителям радиационных повреждений можно отнести не только те клеточные метаболические процессы, которые приводят в конечном итоге к усилению повреждения, но, по нашему мнению, существуют также специальные механизмы ответа клетки на различные стрессовые факторы. К таким клеточным механизмам можно отнести кроссинговер, синтез шаперонов и присутствие в системе виридов.

Важную роль в развитии радиационного ответа клеток играют изменения в надмолекулярной организации мембран, включая плазматические мембраны и мембраны различных клеточных органелл. Обратимые эффекты радиации могут быть длительными и наблюдаться даже через 45 клеточных делений после облучения как проявление нестабильности генома [11].

Как интерфазная, так и репродуктивная смерть могут проявляться в виде апоптоза и/или некроза. Интерфазная гибель клеток имеет много общего с апоптозом, в то время как репродуктивная гибель клеток более сходна по проявлению с некрозом. А именно апоптоз представляет собой активный внутриклеточный механизм, основанный на взаимосогласованном действии специфических протеаз (каспаз), десатураз и эндонуклеаз, в то время как некроз является следствием необратимого разрушения клеточных мембран, за которым наступает коллапс клеточного метаболизма. Экспериментальные данные показывают, что апоптоз и некроз клеток могут легко распознаваться по морфологическим критериям повреждения. Как правило, увеличение частоты клеток с проявлением апоптоза может быть следствием радиационно-индуцированной нестабильности генома. В связи с этим нужно отметить, что некоторыми авторами установлено пострадиационная модификация распределения и активности различных белков, связанных с мембранами, включая аденилатциклазу и Ca^{2+} -АТФ-азу [11].

Клеточные ответы на различные формы радиации не являются строго специфическими и могут быть рассмотрены как ответ на общий стресс, подобный такому, который наблюдается после действия различных вредных веществ и воздействий на клетку.

Дополнительные методы, например гистохимическое определение белков (в нашем случае, продукты GUS-гена), специфические маркеры клеточных органелл и цитоскелета, установление изменений на поверхности клетки и в различных мембранных доменах, использование несущих соединений и других клеточных или молекулярных биологических проб, могут быть включены в общепризнанные протоколы для оценки клеточных изменений, индуцированных радиацией.

Известно, что после выхода из рибосом *de novo* синтезированные белки для нормального функционирования укладываются в стабильные трехмерные структуры с помощью белков-шаперонов (Hsp70, Hsp 104, Hsp 23) [12]. Существуют различные члены семейства Hsp70, функционирующие в разных компартментах клетки: в цитоплазме, митохондриях, хлоропластах и эндоплазматическом ретикулуме. В связи с этим такие белки, как прионы, могут длительное время находиться в клетке и вызвать в организме животных отдаленные необратимые повреждения, хотя клеточные прионы от инфекционных прионов отличаются только третичной структурой. Известно, что в инфекционном белке - прионе (PrP^{Sc}) определено существенно больше так называемых β -слоев - около 40 % (в то время как у (PrP^C) неинфекционного белка клеточного типа - около 3 %) - и несколько уменьшается

количество (43 - 34 %) так называемых α -спиралей [13]. При этом инфекционный белок, образующий амилоидные тяжи, оказывается более кислотоустойчивым, термоустойчивым и более устойчивым к протеолизу по сравнению с его клеточным гомологом PrP^C. То есть из обычного клеточного белка путем модификации возникает инфекционный белок. Исходя из этого, можно предположить, что белки, находящиеся в норме в клетке под действием излучения могут изменить конфигурацию третичной структуры из α - в β -структуру. Такие структурные изменения могут быть стабильными и приводить к существенным морфологическим эффектам, аналогично действию прионов.

Также имеются данные, что вследствие γ -облучения В-ДНК конформация (правозакрученная спираль) может переходить на Z-ДНК - левозакрученную спираль, что было показано на нативных и синтезированных ДНК.

После открытия в 1982 г. Т. Р. Чех с сотрудниками каталитической активности у рибонуклеиновой кислоты возможно опровержение универсального принципа «фермент – это белок». В связи с этим некоторые исследователи вообще считают, что первым веществом наследственности была РНК, а не ДНК, поскольку ей присуща большая функциональная универсальность – она способна хранить информацию, воспроизводиться, направлять синтез белка и вести себя как фермент [14]. Поэтому РНК также можно считать уникальной структурой-мишенью.

Помимо вышеуказанного, внутриклеточным усилителем повреждений под действием радиации могут выступать не только вирусы, но и вириды, так как мы часто наблюдаем у растений, особенно после нейтронного облучения, появление больших сегментов с потерей или изменением пигментации. Частота появления подобных мутаций согласно теоретическим расчетам и экспериментальным данным очень низкая [5]. В этом случае мы наблюдаем морфологические изменения, подобные таким, которые наблюдаются у зараженных виридами растений.

В заключение можно заметить, что любое попадание в мишень имеет отличную от нуля вероятность появления повреждений, что может сказываться на конечных биологических эффектах. Особенно при малых дозах облучения проявление эффекта так называемого гормезиса, или стимуляции, является только реакцией биологической системы, но не является спецификой действия ионизирующего облучения.

Таким образом, вышеприведенные иллюстративные данные показывают, что все три аксиомы теории мишени являются различными этапами в реализации передачи клетке энергии ионизирующего излучения. Передача энергии в клетке может играть роль как первичных повреждений клеточных структур, так и изменения энергетического баланса синтеза, протеолиза и фолдинга, которые сопряжены с различными биологическими механизмами усиления повреждающего действия излучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Окада Ш.* Радиационная биохимия клетки. – М.: Мир, 1974. – 396 с.
2. *Ли Д.Е.* Действие радиации на живые клетки. – М.: Госатомиздат, 1963. – 288 с.
3. *Рашидов Н.М.* Модификация эффектов облучения растений тепловыми нейтронами методом формирования поглощенной дозы: Автореф. дис...д-ра биол. наук. – К., 1994. – 40 с.
4. *Brunner H.* Methods of induction of mutations // *Advances in plant breeding*, SBS Publishers and distributors. – 1991. – P. 187 – 252.
5. *Рашидов Н.М., Гродзинский Д.М.* Относительная биологическая эффективность тепловых нейтронов в индукции соматических мутаций у сои (*Glycine max Z.*) Киев, 1992. - 15 с. (Препр./ НАН Украины. Ин-т кибернетики; 92-34).
6. *Рашидов Н.М., Гродзинский Д.М.* Действие тепловых нейтронов на семена ячменя, обогащенных изотопами с высоким эффективным сечением захвата тепловых нейтронов (*Glycine max Z.*) Киев, 1992. – 11 с. - (Препр./ НАН Украины. Ин-т кибернетики; 92-35).
7. *Kutsokon N., Rashidov N., Grodzinsky D.M.* Unidentified multiaberrant cells as evidence of γ -irradiation in an *Allium*-test // *Abstracts of Sixth International Symposium and Exhibition on Environmental Contamination in*

- Central and Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States. – Prague (Czech Republic). – 2003. – P. 142 – 143.
8. Куцоконь Н.К., Лазаренко Л.М., Безруков В.Ф. та ін. Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності 2. Порівняльний аналіз впливу факторів різної природи // Цитология и генетика. – 2004. – № 1. – С. 55 – 62.
 9. Kutsokon N., Rashydov N., Berezna V., Grodzinsky D. Biotesting of radiation pollutions genotoxicity with the plants bioassays // Radiation safety problems in the Caspian region. Kluwer Academic Publishers. 2004. - P. 51 – 56.
 10. Орел Н.О. Розробка трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana*, чутливих до хімічних мутагенів: Автореф. дис...канд. біол. наук. – Київ, 2003. – 20 с.
 11. Somosy Z. Radiation response of cell organelles // Micron. – 2000. - Vol. 31. – P.165 – 181.
 12. Ерко В.Н. Бактериальные шаперонины // Біополімери і клітина. – 2001. – Т. 17, № 5. – С. 356 – 362.
 13. Shyn W.C., Kao M.C., Chou W.Y. et. al. Heat shock modulates prion protein expression in human NT-2 cells. Neuroreport. - 2000. – Vol. 11, № 4. – P. 771 – 774.
 14. Глазко В.И., Глазко Г.В. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика. – К., КВІЦ, 2002. – 640 с.

Поступила в редакцию 06.12.04,
после доработки - 21.02.05.

**33 МІШЕННІ ТА НЕМІШЕННІ РАДІОБІОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ - ЇХ ПОРОГОВІСТЬ
ТА БЕЗПОРОГОВІСТЬ****Н. М. Рашидов, Н. К. Куцоконь**

Теорія мішені базується на трьох принципах: попадання в чутливий об'єм, ураження мішені та посилення первинних пошкоджень іонізуючого випромінювання на клітину. Простота отриманої з теорії мішені формули об'єднує рівень пошкодження залежно від дози опромінення з параметричним визначенням числа та об'єму мішені. Ця обставина протягом тривалого періоду зробила теорію мішені евристичним методом отримання нових знань як у радіобіології, так і в біології загалом. Пошкодження можна розділити на дві частини: незворотні та зворотні. До незворотних відносять загибель клітин, апоптоз і некроз. До зворотних – морфологічні зміни клітин, що вижили, радіаційну відповідь плазматичної мембрани та органел. До прискорювачів радіаційних пошкоджень можна віднести не тільки відомі клітинні метаболічні процеси, що ведуть до посилення пошкодження, але й існування в клітинах спеціальних механізмів відповіді клітини на різноманітні стресові фактори, включаючи антропогенні. До таких клітинних механізмів можна віднести кросинговер, синтез шаперонів та присутність в системі віроїдів.

TARGET AND NON-TARGET RADIOBIOLOGICAL REACTIONS – ITS THRESHOLD AND NON-THRESHOLD EFFECTS**N. M. Rashydov, N. K. Kutsokon**

Target theory is based on three principles: hitting the sensitive volume, damaging the sensitive volume and acceleration the primary effects of ionizing radiation on the cell. Received simple formula from target theory integrates the level of damage due to irradiation dose and the numbers of the sensitive volume and target parametrically determined. This matter made target theory for long term heuristic method for new knowledge receiving in radiobiology as well as in biology. The damages under influence of radiation are dividing into reversible and nonreversible processes. Cell death, necrosis and apoptosis are reversible damages while morphological alterations of survival cells, reactions of plasmatic membrane and organelles on irradiation are reversible processes. Well known cell processes going to damage intensification and being special mechanisms of cell response on different stress factors (crossingover, shaperons synthesis and viroid presence in system), including antropogenic, were observed as accelerators of radiation damages.

Дані про авторів

Рашидов Намік Мамед огли – д.б.н., завідувач лабораторії біофізики сигнальних систем рослин Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України. Тел: 2578244, факс: 2581050, e-mail: nrashydov@yahoo.com .

Куцоконь Наталія Костянтинівна – м.н.с. відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України. Тел: 2578244, факс: 2581050, e-mail: kutsokon@mail.univ.kiev.ua .