

**ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
ИНСТИТУТ  
ЯДЕРНЫХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ  
ДУБНА**

2333 / 82

12/v-82

P19-82-71

В.И.Корогодин, Е.А.Красавин

**ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧИЯ  
В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ  
С РАЗНЫМИ ФИЗИЧЕСКИМИ  
ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Направлено в журнал "Радиобиология"

**1982**

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Уже на ранних этапах развития радиобиологии было отмечено, что разные виды ионизирующих излучений при воздействии на живые клетки различаются по своей эффективности. Позднее выяснилось, что закономерности зависимости биологической эффективности излучений от величины их линейной передачи энергии, которую обозначают обычно ЛПЭ или  $L$ , сложны и неоднозначны.

Для оценки биологической эффективности излучений, различающихся между собой величиной  $L$ , обычно используют понятие относительной биологической эффективности /ОБЭ/, которую определяют как отношение доз "стандартного" /обычно 200-кВ рентгеновы или  $\gamma$ -лучи/ и исследуемого излучения при равных величинах эффектов. В экспериментах, где критерием оценки радиобиологического эффекта служит выживаемость клеток, часто используют отношение:

$$\frac{D_0 \text{ стандартного излучения}}{D_0 \text{ исследуемого излучения}} = \text{ОБЭ}_{\text{исследуемого излучения}}$$

где  $D_0$  - "средняя доза", при которой в каждой клетке в среднем возникает по одному "инактивирующему повреждению". Выживаемость  $S$  клеток связана с дозой облучения  $D$  через параметр  $D_0$  /в случае экспоненциальных кривых выживания, например,

$$S = \exp(-D/D_0)$$

Поэтому величина  $D_0$  может служить мерой радиорезистентности клеток, а величина  $D_0^{-1}$  - мерой радиочувствительности клеток или эффективности облучения. В дальнейшем изложении в качестве показателя радиочувствительности клеток мы будем использовать параметр  $D_0^{-1}$  независимо от того, рассматривается ли эта величина сама по себе или при сопоставлении значений радиочувствительности разных клеток при действии какого-либо одного или разных видов излучений.

Так как значения ОБЭ определяются из отношения  $D_0$  для стандартного и  $D_0$  для исследуемого излучений, то термин "относительная биологическая эффективность" создает определенный настрой, при котором различия в чувствительности клеток к воздействию разных излучений связываются только со свойствами этих излучений. Вместе с тем, как это будет показано ниже, не менее важная роль здесь принадлежит и биологическим особенностям самих клеток.

Прежде чем приступить к рассмотрению закономерностей изменения радиочувствительности клеток при действии разных видов излучений, сделаем несколько замечаний, касающихся важной характеристики качества излучения -  $L$ , которая является энергией, переданной заряженной частицей веществу, отнесенной к единице пути. Обычно  $L$  измеряется в килоэлектронвольтах на 1 мкм /кэВ/мкм/. Следует различать  $L$  заряженной частицы и тормозную способность вещества /измеряемую в мегаэлектронвольтах на 1 см<sup>2</sup> г<sup>-1</sup> /, которая характеризует отнесенную к единице пути потерю энергии заряженной частицы в данном веществе плотностью  $\rho$ . Величина  $L \rho^{-1}$  не зависит от плотности вещества. В случае, когда можно пренебречь потерей энергии на тормозное излучение,  $L$  равна тормозной способности<sup>1/</sup>. При дальнейшем изложении под  $L$  будем понимать характеристику излучения, являющуюся усредненной макроскопической величиной.

## 2. ФОРМЫ КРИВЫХ ВЫЖИВАНИЯ И РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ИЗЛУЧЕНИЙ С РАЗНОЙ $L$

Как известно, кривые выживания клеток в зависимости от дозы излучений можно разделить на два класса: экспоненциальные и сигмоидные. При действии частиц с возрастающими значениями  $L$  часто наблюдается трансформация сигмоидных кривых в экспоненциальные, но превращения экспоненциальных в сигмоидные никогда не происходит.

Клетки с экспоненциальными кривыми выживания также можно подразделить на два класса по форме зависимости  $D_0^{-1}$  от  $L$ .

Первый класс характеризуется зависимостью, представленной на рис. 1а. Для нее характерны максимальные значения  $D_0^{-1}$  образующие плато при малых величинах  $L$ , и постепенное уменьшение  $D_0^{-1}$  при возрастании  $L$  /зависимость  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода/. Такая зависимость типична для большинства прокариот-вирусов и многих видов бактерий<sup>2-4/</sup>. Величины ОБЭ в этом случае не превышают 1, а нисходящей ветви кривой  $D_0^{-1}(L)$  соответствует уменьшение их значений.

Второй класс клеток с экспоненциальными кривыми выживания характеризуется такой зависимостью  $D_0^{-1}(L)$ , которая описывается кривой с максимумом /зависимость  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода/. В этом случае радиочувствительность клеток с увеличением  $L$  вначале мало изменяется, затем возрастает до некоторого максимума, и лишь после этого, при дальнейшем увеличении  $L$ , уменьшается /рис. 1б/. Максимум радиочувствительности соответствует наибольшим значениям ОБЭ. Этот тип зависимости свойствен некоторым видам бактерий и гаплоидным дрожжам<sup>2,6,7/</sup>.

Для клеток с сигмоидными кривыми выживания /диплоидные дрожжи, клетки млекопитающих/ всегда характерна зависимость

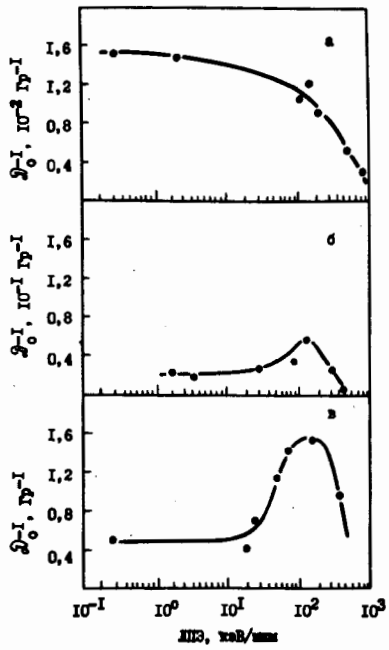


Рис.1. Зависимость  $D_0^{-1}$  от ЛПЭ для бактерий *E. coli* /7/ /а/ /4/, гаплоидных дрожжей /б/ /19/ и клеток китайского хомяка /в/ /10/. Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: радиочувствительность клеток,  $D_0^{-1}$ ,

$D_0^{-1}$  (L) 2-го рода /8-10/. Пример такой зависимости приведен на рис.1в.

Важным параметром, характеризующим особенности взаимодействия корпускулярных видов излучений с клетками, является величина поперечного сечения инактивации  $\sigma$ , которую можно определить, если  $D$  выражать не в количестве поглощенной энергии, а в числе частиц  $F$ , прошедших через единицу площади. Величина  $\sigma$  связана с  $D_0^{-1}$  как:

$$\sigma = D_0^{-1} L \rho^{-1} \quad /1/$$

Поскольку  $D = F L \rho^{-1}$ , то для экспоненциальных кривых выживаемости

$$S = \exp(-D D_0^{-1}) = \exp(-F L \rho^{-1} D_0^{-1}) = \exp(-\sigma F) \quad /2/$$

Для клеток, которым свойственна зависимость  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода, связь величины  $\sigma$  с  $L$  описывается кривой 1, представленной на рис.2 /зависимость  $\sigma(L)$  1-го рода/. На этой кривой можно отметить три характерных компонента: область линейного возрастания  $\sigma$  с увеличением  $L$ , область перегиба кривой и плато, соответствующее постоянному значению  $\sigma$  при высоких величинах  $L$ . При сопоставлении кривых  $D_0^{-1}(L)$  и  $\sigma(L)$  видно, что участок линейного возрастания  $\sigma$  соответствует плато на кривой зависимости  $D_0^{-1}(L)$ , когда  $0.5 \leq 1$ , а область плато  $\sigma(L)$  - нисходящей ветви кривой  $D_0^{-1}(L)$ , когда  $0.5 < 1$ .

Кривая 2 на рис.2 описывает  $\sigma(L)$  для клеток, которым свойственна зависимость  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода. Кривая зависимости  $\sigma(L)$  2-го рода имеет следующие компоненты: область линейного возрастания  $\sigma$  с увеличением  $L$ , область квадратичного возрастания  $\sigma$ , область перегиба кривой и плато, соответствующее постоянному значению  $\sigma$ . При сопоставлении кривых  $D_0^{-1}(L)$  и  $\sigma(L)$  2-го рода видно, что область квадратичного возрастания  $\sigma$  соот-

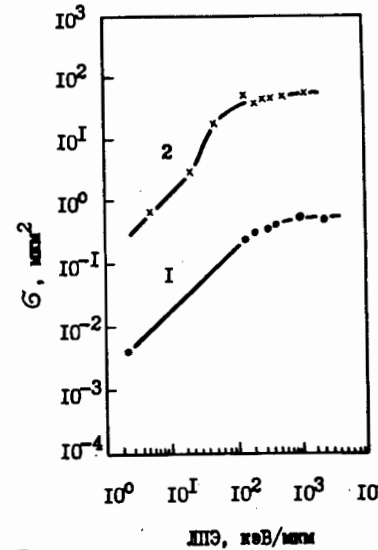


Рис.2. Зависимость поперечного сечения инактивации для бактерий *E. coli* /1/ /4/ и клеток китайского хомяка /2/ /10/ от ЛПЭ. Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: поперечное сечение инактивации,  $\text{мкм}^2$ .

ветствует области увеличения  $D_0^{-1}$  до максимальных значений, а область плато - уменьшению  $D_0^{-1}$  с ростом  $L$ . При одинаковых значениях энергии частиц на один нуклон в области плато  $\sigma = \text{const}$  /3,4,7,10/.

Таким образом, клетки по их реакциям на воздействие излучений разного качества можно разделить на три класса:

1-й класс:  $S(D)$  - экспоненциальная,  $D_0^{-1}(L)$  - 1-го рода;

2-й класс:  $S(D)$  - экспоненциальная,  $D_0^{-1}(L)$  - 2-го рода;

3-й класс:  $S(D)$  - сигмоидная,  $D_0^{-1}(L)$  - 2-го рода.

Форма  $S(D)$  имеет значение при  $L \leq 10^2$  кэВ/мкм, а форма  $D_0^{-1}(L)$  при  $L$  от 10 до  $10^3$  кэВ/мкм.

Формально зависимость  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода можно объяснить моделью "одна мишень - одно попадание", когда для инактивации клетки необходимо и достаточно возникновения одной первичной ионизации в пределах мишени или "чувствительного объема" /11-13/. В этом случае  $S(D)$  имеет экспоненциальную форму, биологическая эффективность частиц в диапазоне малых  $L$  постоянна, а затем уменьшается.

Действительно, пусть  $n\ell$  - среднее число первичных ионизаций в мишени толщиной  $\ell$ , где  $n$  - среднее число первичных ионизаций на единицу длины, равное  $Lw^{-1}$ , где  $w$  - энергия, необходимая для образования одной пары ионов. Вероятность  $P(x)$ , что число этих ионизаций равно  $x$ , определяется как:

$$P(x) = \exp(-n\ell)(n\ell)^x / x! \quad /3/$$

В случае, когда не происходит ни одной ионизации,

$$P_{(0)} = \exp(-n\ell) \quad /4/$$

Вероятность  $P$ , что, по крайней мере, одна первичная ионизация имеет место, равна:

$$p = 1 - \exp(-n\ell) = 1 - \exp(-Lw^{-1}\ell) \quad /5/$$

Очевидно, что  $\sigma = \sigma_0 p$ , где  $\sigma_0$  - геометрическое поперечное сечение мишени. Тогда

$$\sigma = \sigma_0 [1 - \exp(-Lw^{-1}l)], \quad /6/$$

а выживаемость клеток при облучении потоком частиц  $F$  равна:

$$S = \exp(-F\sigma) = \exp\{-F\sigma_0 [1 - \exp(-Lw^{-1}l)]\} = \\ = \exp\{-D\sigma_0 [1 - \exp(-Lw^{-1}l)]L^{-1}\}. \quad /7/$$

Очевидно, что радиочувствительность клеток данного типа равна:

$$D_0^{-1} = \sigma_0 [1 - \exp(-Lw^{-1}l)]L. \quad /8/$$

Пусть  $L_t$  - область  $L$ , соответствующая перегибу кривой  $D_0^{-1}(L)$ . Из /8/ следует, что при  $L < L_t$   $D_0^{-1} = \text{const}$ , а при  $L > L_t$  величина  $D_0^{-1}$  уменьшается. Согласно /6/, при увеличении  $L$   $\sigma$  стремится к  $\sigma_0$ . Это означает, что каждая частица с  $L > L_t$  при прохождении через чувствительный объем клетки будет приводить к инактивации с вероятностью, равной 1; биологическая эффективность излучений с  $L > L_t$  на единицу поглощенной дозы будет уменьшаться, а на одну частицу будет оставаться постоянной. Таким образом, зависимость  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода можно однозначно интерпретировать в терминах физических характеристик ионизирующих излучений.

Кривые  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода, как мы уже отмечали, свойственны клеткам и с экспоненциальными кривыми выживания /гаплоидные дрожжи/, и с сигмоидными кривыми /диплоидные дрожжи, клетки млекопитающих/. Такую форму зависимости радиочувствительности от  $L$  можно объяснить с разных позиций /13/. Можно предположить, что для инактивации таких клеток необходимо осуществление нескольких попаданий в одну мишень или не менее одного попадания в каждую из нескольких мишеней. Событиями попадания могут служить или одна ионизация, или группа из нескольких ионизаций. Очевидно, что такая ситуация не поддается однозначной интерпретации. Общим, однако, является то, что для инактивации объектов с  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода требуется значительно большее количество энергии, чем для объектов с  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода.

Из многочисленных моделей, предложенных в разное время для интерпретации зависимости  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода в терминах физики ионизирующих излучений и геометрии мишеней, наибольшего внимания, пожалуй, заслуживает модель К.Гюнтера и В.Шульца /14/. Однако недавно было установлено, что на форму кривых  $D_0^{-1}(L)$  большое влияние оказывает свойство клеток восстанавливаться от лучевых повреждений. Познакомимся с этими данными более подробно.

### 3. РОЛЬ ПОСТРАДИАЦИОННОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ЗАВИСИМОСТИ $D_0^{-1}(L)$

Известно несколько форм и механизмов восстановления клеток от лучевых повреждений, которые присущи как прокариотам, так и эукариотам. Считается, что в конечном итоге репарация - это восстановление нарушенной структуры ДНК. Во всех случаях благодаря деятельности репарационных ферментов происходит или исправление структурных нарушений в молекуле ДНК, вызванных облучением, или ликвидация дефектов в ДНК, синтезированной на поврежденной ДНК-матрице /15/.

У прокариот, большинству из которых свойственна зависимость  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода, весьма детально идентифицированы основные этапы репарации ДНК и ее молекулярные механизмы. К числу репарируемых клеткой повреждений относятся и одонитевые разрывы /ОР/ ДНК. В то же время двунитевые разрывы /ДР/ ДНК обычно являются летальными событиями /16/. Однако следует различать два типа ДР, имеющих разное происхождение.

Известно, что при действии ионизирующих излучений образуются как прямые, так и косые ДР /17,18/. Прямые ДР возникают в результате одновременного повреждения комплементарных участков обеих нитей ДНК. Косые ДР образуются в результате перекрытия двух близко расположенных друг от друга ОР в разных нитях ДНК, вследствие ферментативной деградации поврежденных участков. В силу того, что ОР активно репарируются клеткой в процессе сверхбыстрой и быстрой репарации с участием ДНК-полимераз и ДНК-лигаз /15,18/, образование косых ДР и их репарация зависят от интенсивности деградации поврежденных участков и эффективности работы ресинтезирующих ферментов. Предварительные оценки показывают, что при действии  $\gamma$ -лучей косые ДР у *E.coli* составляют значительную часть от общего числа ДР /18/. ДР такого происхождения весьма интенсивно репарируются клеткой, в отличие от прямых ДР, репарация которых требует участия рекомбинационных механизмов /15/.

У *E.coli* с диким репарационным генотипом возникновение даже одного нерепарированного ДР /косого или прямого/ является летальным событием. Величина дозы облучения, при которой образуется в среднем один такой ДР на геном, в этом случае точно соответствует значению  $D_0$ , определяемому по выживаемости /16/. У радиочувствительных репарационных мутантов такого соответствия нет: в этом случае  $D_0$  в несколько раз меньше дозы, при которой происходит образование в среднем одного ДР на геном. В то же время значения доз, при которых образуется в среднем один ДР у репарационных мутантов и у клеток с диким репарационным генотипом с ингибированной системой репарации, примерно одинаковы. Следовательно, для радиочувствительных мутантов летальными событиями служат не только ДР, но и другие повреждения ДНК.

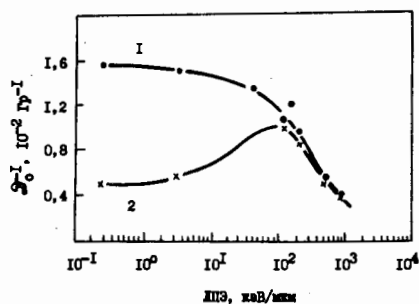


Рис.3. Зависимость  $D_0^{-1}$  (ЛПЭ) для бактерий *E.coli* при облучении в обычных условиях (●) и в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтиламина (x)<sup>4/</sup>. Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: радиочувствительность клеток,  $D_0^{-1}$ ,  $\text{Гр}^{-1}$ .

Все это позволяет сделать вывод о том, что в области плато кривой  $D_0^{-1}$  (L) 1-го рода, характерной для *E.coli* с диким гено-типом, летальному событию соответствует образование в ДНК одного ДР, а нисходящая ветвь этой кривой отражает возрастание числа ДР на  $D_0$  на геном.

Когда более сбалансированная система репарации уменьшает вероятность образования ДР из перекрывающихся ОР, можно ожидать возрастания радиорезистентности клеток к воздействию излучений с малой ЛПЭ. Такая ситуация, по-видимому, наблюдается при модификации радиочувствительности клеток химическими радиопротекторами. Согласно<sup>19/</sup>, химические радиопротекторы, замедляя стадию экзонуклеазной расчистки брешей в нитях ДНК или скорость инцизии  $\gamma$ -сайтов, создают условия для лучшей балансировки между процессами деградации поврежденных участков ДНК и их реинтезона, что приводит к снижению вероятности образования ферментативных ДР ДНК. Поскольку с увеличением ЛПЭ излучений вклад прямых ДР в суммарный выход ДР возрастает<sup>14/</sup>, эффективность радиопротекторов при увеличении L должна снижаться. Это хорошо согласуется с данными по облучению бактерий *E.coli* тяжелыми ионами в условиях защиты  $\beta$ -меркаптоэтиламином<sup>4/</sup>. Наблюдающуюся при этом трансформацию кривой  $D_0^{-1}$  (L) 1-го рода в кривую 2-го рода /рис.3/ можно объяснить эффективной репарацией "косых" ДР при малых ЛПЭ и отсутствием репарации прямых ДР, вклад которых в повреждения ДНК с увеличением ЛПЭ возрастает. Можно думать, что у прокариот зависимость  $D_0^{-1}$  (L) 2-го рода отражает интенсивно идущие процессы репарации от повреждений ДНК, приводящих к возникновению "косых" ДР.

У эукариот /дрожжи, клетки млекопитающих/, как и у прокариот, ДР в ДНК наиболее опасные последствия облучения. По мнению ряда авторов<sup>20,21/</sup>, именно ДР являются причиной образования хромосомных aberrаций, которые и приводят такие клетки к гибели<sup>22/</sup>. Радиорезистентность этих клеток, следовательно, также должна отражать их способность к репарации ДР ДНК.

Известно, что в расчете на один набор хромосом диплоидные

клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* примерно в 25 раз устойчивее гаплоидных. Было установлено, что гаплоидные и диплоидные клетки погибают при облучении за счет однотипных лучевых повреждений - хромосомных летальных мутаций<sup>23/</sup>. Различия в радиорезистентности гаплоидных и диплоидных дрожжей обусловлены, по-видимому, свойством диплоидных клеток восстанавливаться от ДР ДНК, которые не репарируются гаплоидными клетками<sup>24/</sup>.

Если у диплоидных дрожжей блокировано свойство восстанавливаться от лучевых повреждений, они утрачивают способность репарировать ДР<sup>24/</sup> и становятся примерно в два раза радиочувствительнее, чем гаплоидные<sup>25/</sup>. Чувствительность таких клеток повышается в основном к воздействию  $\gamma$ -лучей, но мало изменяется при облучении  $\alpha$ -частицами<sup>25/</sup>; у клеток эукариот с нарушенной репарацией ДР зависимость  $D_0^{-1}$  (L) 2-го рода имеет тенденцию модифицироваться в сторону кривой  $D_0^{-1}$  (L) 1-го рода.

Такая модификация кривой  $D_0^{-1}$  (L) при нарушении диплоидспецифической репарации дает основание полагать, что форма этой кривой в значительной мере обусловлена эффективностью репарации ДР при действии излучений с малыми L. Как следует из работы<sup>26/</sup>, в которой оценивался первичный выход G ДР в клетках китайского хомяка при облучении частицами с разной L, число ДР на  $D_0$  на геном /G· $D_0$ · геном/ в диапазоне L от 0,3 до 150 кэВ/мкм примерно постоянно и равно 38, а при дальнейшем возрастании L увеличивается /рис.4, кривая 1/. Область плато этой кривой соответствует максимальной радиочувствительности клеток /рис.4, кривая 2/ и выходу кривой зависимости  $\sigma$ (L) на плато  $\sigma_0$ . Это означает, что прохождение одной частицы с  $L=L_t = 150-200$  кэВ/мкм через ядро такой клетки приводит к образованию около 38 ДР и вызывает ее инактивацию с вероятностью, равной 1.

Первичный выход ДР оценивался в этих экспериментах в условиях ингибированной системы репарации и нормировался на  $D_0$  излучений с разными L, определяемую по кривой выживания. Доза, при которой происходит образование 38 ДР на геном, соответ-

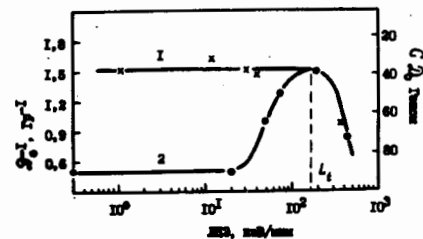


Рис.4. Зависимость от ЛПЭ радиочувствительности (●)<sup>9/</sup> и выхода первичных ДР ДНК (x)<sup>26/</sup> для клеток китайского хомяка V-79. Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: радиочувствительность клеток,  $D_0^{-1}$ ,  $\text{Гр}^{-1}$  /справа/; выход первичных ДР на  $D_0$  на геном, абсолютн. ед. /слева/.

ствуется  $D_0$  при действии частиц с  $L=L_t$  /рис.4/. Это может означать, что при действии излучений с  $L=L_t$  клетки млекопитающих неспособны репарировать ДР, хотя при облучении частицами с низкой  $L$  они, как известно, интенсивно восстанавливаются от таких повреждений. Следовательно, при подавлении способности клеток к восстановлению выход ДР на  $D_0$  на геном должен быть постоянным до значений  $L=L_t$ , а при дальнейшем увеличении  $L$  должен возрастать. Это и находит свое отражение на рис.4, где показано, что для клеток млекопитающих зависимость  $D_0^{-1}(L)$  описывается кривой 2-го рода, а зависимость  $G \cdot D_0 \cdot \text{геном}/(L)$  - кривой 1-го рода.

Разная репарируемость ДР, образующихся в клетках млекопитающих при действии излучений с малой  $L$  и плотноионизирующих частиц, может свидетельствовать об их качественных различиях. Известно, что выход ДР на единицу дозы облучения с увеличением  $L$  возрастает, увеличивается и доля прямых ДР /14/. В случае воздействия  $\gamma$ -лучей нельзя исключить возможности формирования ДР из ОР, которые, вероятно, легче репарируются клеткой. Имеются данные /27/ о том, что при возникновении ОР комплементарный участок противоположной нити ДНК в клетках млекопитающих может подвергаться действию эндонуклеаз и также разрываться, образуя ДР; такие ДР легче репарируются клеткой по сравнению с прямыми ДР, репарация которых осуществляется по рекомбинационному механизму.

Такая точка зрения согласуется с данными об эффективной лимфической защите клеток млекопитающих при действии  $\gamma$ -лучей /28/ и отсутствии таковой при облучении тяжелыми ионами /29/. Если допустить, что реализация защитного действия радиопротекторов у клеток млекопитающих осуществляется по таким же механизмам, что и у бактерий /путем уменьшения вероятности образования ДР из ОР вследствие замедления эндо- или экзонуклеазной активности/, то зависимость эффективности химической защиты от  $L$  излучений и в этом случае может свидетельствовать о модификации радиопротекторами процессов образования ДР из ферментативных ОР.

Как мы уже отмечали, в литературе есть указания на то, что при действии тяжелых ионов на клетки эукариот репарация повреждений сильно ограничена или отсутствует. Так, в опытах с клетками млекопитающих при фракционировании дозы тяжелых ионов обнаружена полная аддитивность отдельных лучевых фракций /30/. Изучение репарации ОР и ДР ДНК у клеток млекопитающих, облученных  $\gamma$ -лучами и  $\alpha$ -частицами, показало, что восстановление структуры ДНК от ДР во втором случае возможно лишь в ограниченном диапазоне доз /31/. Отмечалась также значительно меньшая репарируемость ОР и ДР ДНК в клетках млекопитающих, облученных  $\pi$ -мезонами, чем после действия рентгеновых лучей /32/.

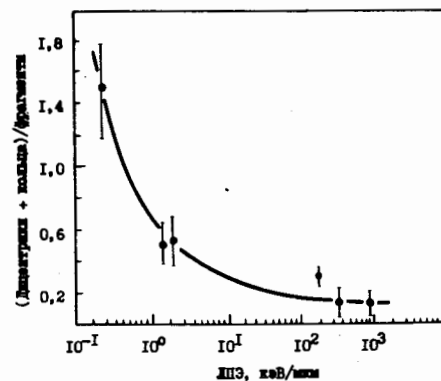


Рис.5. Влияние ЛПЭ излучений на относительное содержание перестроек хромосом и фрагментов в лимфоцитах человека /33/. Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: относительное число перестроек /дицентрики + кольца/ и фрагментов хромосом.

Снижение эффективности репарации ДР в случае воздействия плотноионизирующих частиц подтверждается и данными цитогенетического анализа клеток млекопитающих /33/. Летальное действие излучений на клетки млекопитающих обычно связывают с возникновением таких нарушений хромосом, как фрагменты и различного рода перестройки. Образование фрагментов обязано, по-видимому, неосуществлению восстановления ДНК от ДР. Тогда отношение выхода перестроек к выходу фрагментов может служить косвенным показателем эффективности репарации от ДР. Представленные таким образом данные работы /33/ приведены на рис.5. Можно видеть, что с увеличением  $L$  эффективность репарации в лимфоцитах человека уменьшается почти в десять раз.

В настоящее время однозначно связать уменьшение эффективности репарации при возрастании  $L$  с каким-либо одним механизмом не представляется возможным. Однако ясно, что эффективность работы репарационных систем обусловлена как особенностями организации генетического аппарата клетки, так и степенью поврежденности структур мишеней, которые подлежат восстановлению. При возрастании ЛПЭ излучений до значений, соответствующих максимуму кривой  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода и больших, количество энергии в среднем на одно событие попадания увеличивается, и повреждения становятся все менее обратимыми. Это обстоятельство, по-видимому, вносит существенный вклад в наличие максимума на кривой  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода.

#### 4. ПОСТРАДИАЦИОННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ И МОДИФИКАЦИЯ КРИВОЙ $D_0^{-1}(L)$

Весьма информативными для решения вопроса о роли пострадиационного восстановления в биологической эффективности излучений с разной  $L$  могут быть эксперименты с такими биологическими объектами, у которых либо нарушены те или иные этапы репарации, либо репарация осуществляется более эффективно,

чем у клеток с диким генотипом. Особый интерес в этом отношении представляет изучение трансформации кривых  $D_0^{-1}(L)$  у радиочувствительных и радиорезистентных мутантов. Однако, прежде чем рассмотреть возможные варианты такой трансформации, необходимо сделать несколько замечаний о специфике энерговыделения в треках тяжелых заряженных частиц при прохождении их через вещество.

Известно, что основным механизмом, посредством которого энергия нерелятивистской частицы передается облучаемому веществу, является ионизация атомов. Ионизация производится как самой частицей, так и  $\delta$ -электронами, образующимися вдоль геометрической оси трека. Трек ионизирующей частицы принято считать состоящим из двух областей - сердцевины трека и области  $\delta$ -электронов. Радиус  $r_{\text{макс}}$  трека не зависит от вида заряженной частицы, поскольку энергия  $\delta$ -электронов, формирующих границу трека, от заряда частицы  $Z_0$  не зависит. Величина  $r_{\text{макс}}$  определяется только скоростью частицы или ее энергией на один нуклон  $E^{1/1,34}$ .

При определении зависимости  $D_0$  от  $L$  разные значения  $L$  следует получать путем использования частиц, имеющих одинаковую  $E$ , но различающихся по  $Z_0$ . Только в этом случае будет соблюдаться постоянство энергетического спектра  $\delta$ -электронов, и при условии, что  $r_{\text{макс}} < r_g$  /где  $r_g$  - радиус мишени/, а  $L > L_t$ ,  $\sigma$  будет равно  $\sigma_0$ .

Точное определение микрораспределения энергии передаваемой частицей возможно с применением методов микродозиметрии<sup>1,14/</sup>. В ряде случаев для описания этого распределения можно использовать модель радиального распределения поглощенной энергии<sup>35/</sup>.

Пусть для инактивации клетки в мишени объема  $v$  должно произойти поглощение энергии  $\epsilon = D_0 \rho v$ , где  $\rho$  - плотность мишени. В треках частиц, имеющих одинаковые  $E$ , но различающихся по эффективному заряду  $Z$ ,  $\epsilon$  выделяется на тем больших расстояниях  $r_{\text{эфф}}$  от геометрической оси трека, чем больше  $Z$ <sup>34/</sup>. Если полагать, что у бактерий "дикого типа" /wt/, способных ликвидировать ОР ДНК, эффективность репарации не меняется на линейном участке кривой  $\sigma(L)$ , то определенное количество энергии, выделяемой частицами с такими значениями  $L$ , будет как бы "сниматься" репарационной системой. В этом случае для достижения  $\epsilon = \epsilon_{wt}$  на расстоянии  $r_{\text{эфф}}$  требуется прохождение частицы с энергией  $E$  и  $Z = Z_{wt}$ . Тогда для мутантов (rad) с нарушенной системой репарации ОР  $\epsilon = \epsilon_{rad}$  будет выделяться при тех же  $r_{\text{эфф}}$  и  $E$  в случае прохождения частицы с  $Z = Z_{rad} < Z_{wt}$  и соответственно меньшими  $L$ . Отсюда следует, что  $\sigma$  для клеток с нарушенной репарацией ОР при одинаковых  $L$  будет иметь большие значения по сравнению с объектами, имеющими нормальный репарационный генотип. Вследствие этого кривая  $\sigma(L)$  1-го рода не только

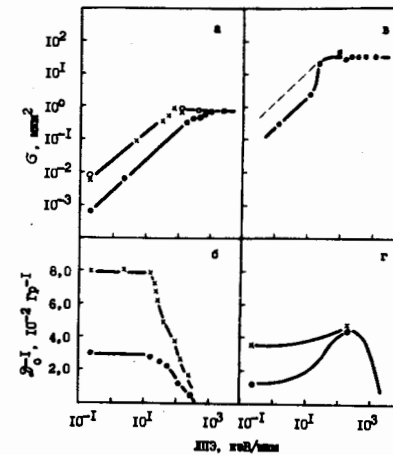


Рис. 6. Модификация зависимости  $\sigma$  (ЛПЭ) и  $D_0^{-1}$  (ЛПЭ) про- и эукариотических клеток при нарушении репарации: - зависимость  $\sigma$  (ЛПЭ) /а/ и  $D_0^{-1}$  (ЛПЭ) /б/ для бактерий *E. coli* B/r (●) и *B\_s-1* (x)<sup>37/</sup>, (o)<sup>36/</sup>; - зависимость  $\sigma$  (ЛПЭ) для клеток китайского хомяка /в/ <sup>10/</sup> /пунктиром показана ожидаемая зависимость  $\sigma$  (ЛПЭ) для клеток при нарушении репарации ДР/; - радиочувствительность диплоидных дрожжей *S. cerevisiae* /г/ дикого типа (●) и мутанта rad -51(x) при действии  $\gamma$ -лучей и  $\alpha$ -частиц<sup>25/</sup>.

Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: а, в - поперечное сечение инактивации, мкм<sup>2</sup>; б, г - радиочувствительность клеток,  $D_0^{-1}$ , Гр<sup>-1</sup>.

будет сдвигаться влево относительно кривой  $\sigma(L)$  для клеток с диким генотипом, но и выход на плато этой кривой будет происходить в области меньших значений  $L$ , при одинаковых значениях  $\sigma_0$  /рис. 6а/.

К этому выводу можно придти и другим путем. Действительно, пострадиационное восстановление у клеток дикого типа, по сравнению с радиочувствительными мутантами, не влияя на экспоненциальный характер кривой выживания, изменяет лишь угол ее наклона<sup>37/</sup>:

$$S = \exp(-D \cdot D_0^{-1}) (1 - R), \quad /9/$$

где  $R$  - вероятность репарации отдельных повреждений, когда клетки репарируют каждое из них независимо от других. Если  $R = \text{const}$  в области плато кривой  $D_0^{-1}(L)$ , репарация, не изменяя формы кривой  $D_0^{-1}(L)$ , будет приводить к сдвигу области плато по оси ординат на величину  $(1 - R)$  /рис. 6б/:

$$S = \exp\{-D \sigma_0 [1 - \exp(-Lw^{-1}l)] L^{-1} (1 - R)\}. \quad /10/$$

Теперь рассмотрим возможные модификации кривых  $\sigma(L)$  2-го рода, характерных для эукариот. Уже упоминалось, что в отличие от кривых  $\sigma(L)$  1-го рода, где  $\sigma$  линейно возрастает с  $L$ , у кривых  $\sigma(L)$  2-го рода имеется область квадратичного возрастания  $\sigma$ , которая соответствует повышению биологической эффективности излучений с ростом  $L$  до максимальных значений. Согласно<sup>36/</sup>:



$$\sigma = \frac{m}{w} L \frac{\bar{A}}{N} (1 - R),$$

/11/

где  $m$  - число мишеней, ответственных за поражение клетки,  $\bar{A}$  - средний атомный вес,  $N$  - число Авогадро. Из сопоставления /11/ и рис.6в следует, что квадратичное возрастание  $\sigma$  можно объяснить только тем, что на данном интервале  $L$  вероятность восстановления  $R$  уменьшается.

У репарационных мутантов диплоидных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, у которых понижена способность к репарации ДР ДНК, как уже отмечалось, повышается чувствительность к  $\gamma$ -лучам, но мало меняется к  $\alpha$ -частицам. Как показано на рис.6г, кривая  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода трансформируется при этом в кривую 1-го рода. Пунктиром на рис.6в показана ожидаемая трансформация кривой  $\sigma(L)$  при полном подавлении способности к репарации ДР ДНК у клеток млекопитающих.

Высота пика кривой  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода, то есть максимальное значение ОБЭ, как можно думать, обусловлены тем, насколько эффективно клетки репарируют ДР ДНК при действии излучений с малой  $L$ . Это, по-видимому, находит отражение в особенностях зависимости  $D_0^{-1}(L)$  для некоторых типов клеток млекопитающих, например, для клеток лимфомы мышей<sup>/37/</sup>, не способных репарировать ДР ДНК<sup>/38/</sup>. Характерными особенностями этих клеток, в отличие от других клеток млекопитающих, являются более высокая радиочувствительность и экспоненциальность кривых выживания при действии  $\gamma$ -лучей, меньшие максимальные значения ОБЭ, более широкий максимум на кривой  $D_0^{-1}(L)$  и сдвиг его в область меньших значений  $L$  /примерно 70 кэВ/мкм/.

По-видимому, зависимость радиочувствительности от ЛПЭ для клеток эукариот с разной степенью выраженности репарации ДР будет описываться семейством кривых  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода, которые при полном блоке репарации ДР могут трансформироваться в кривую  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода; при нарушении репарации не только ДР, но и ОР, можно ожидать дальнейшей трансформации кривой  $D_0^{-1}(L)$  путем сдвига ее плато вверх по оси ординат, а перегиба - в область меньших значений  $L$  /рис.7а/.

Для тех клеток прокариот, которым свойственна репарация ДР, можно ожидать трансформации кривой  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода в кривую 2-го рода /рис.7б/. Такую трансформацию, по-видимому, можно будет наблюдать у полигеномных клеток *E.coli*, способных репарировать ДР<sup>/39/</sup>, а также у суперрезистентных мутантов *E.coli* с хорошо сбалансированными процессами эндонуклеазной активности и ресинтезом поврежденных участков ДНК<sup>/40/</sup>. Зависимость  $D_0^{-1}(L)$  2-го рода, характерная для *Vac.subtilis*<sup>/5/</sup>, также, по-видимому, может быть объяснена присущей им способностью репарации ДР<sup>/41/</sup>.

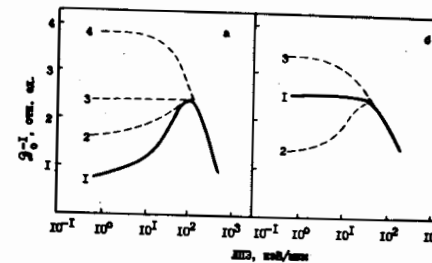


Рис.7. Ожидаемые модификации кривых  $D_0^{-1}$  (ЛПЭ) при разной степени выраженности репарации: а/ кривые  $D_0^{-1}$  (ЛПЭ) для диплоидных клеток эукариот при ненарушенной способности репарации ДР и ОР /1/; при частичном нарушении способности репарировать ДР /2/; при полном блоке репарации ДР /3/ и при нарушении репарации ОР /4/;

б/ кривые  $D_0^{-1}$  (ЛПЭ) для клеток прокариот: дикого репарационного генотипа /1/, в случае репарации ДР ДНК /2/ и при подавлении репарации ОР /3/.

Ось абсцисс: ЛПЭ, кэВ/мкм; ось ординат: радиочувствительность,  $D_0^{-1}$ , относит. ед.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Попробуем теперь суммировать наши представления об основных факторах, определяющих различия в биологической эффективности ионизирующих излучений с разной  $L$ .

Как у про-, так и у эукариот основными летальными повреждениями являются ДР ДНК.

Большинство прокариот, в том числе *E.coli* с диким репарационным генотипом, не способны репарировать ДР, и возникновение одного ДР в генетическом аппарате является абсолютно летальным событием; об этом свидетельствует совпадение  $D_0$ , определяемой по выживаемости клеток, и дозы, при которой образуются в среднем один нерепарированный ДР на геном. Для таких клеток характерна кривая  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода, область плато которой соответствует одному ДР на  $D_0$  на геном, а нисходящая ветвь отражает возрастание числа ДР на  $D_0$  на геном.

При действии излучений с малой  $L$  значительное количество ДР образуется из ОР, которые обычно эффективно репарируются клеткой. Нерепарированные ферментативные ДР, по-видимому, играют большую роль в летальном действии редкоионизирующих излучений. Выход таких повреждений можно уменьшить, применяя радиопротекторы. С повышением  $L$  излучений вероятность образования прямых ДР увеличивается, а ферментативных ДР - уменьшается, что и находит свое отражение в ослаблении модифицирующего влияния радиопротекторов с увеличением  $L$ . Следствием этого под влиянием радиопротекторов у прокариот наблюдается трансформация кривой  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода в кривую 2-го рода. Аналогичную трансформацию можно ожидать для гиперрезистентных мутантов *E.coli* и для полигеномных бактерий, способных к ре-



парации прямых ДР. У радиочувствительных репарационных мутантов летальными являются также повреждения, не относящиеся к ДР, и для этих клеток характерна зависимость  $D_0^{-1}(L)$  1-го рода.

Для клеток эукариот ДР также являются наиболее тяжелыми повреждениями ДНК, которые служат у них молекулярной основой формирования хромосомных aberrаций. Клетки диплоидных эукариот, в отличие от гаплоидных, активно репарируют ДР благодаря наличию механизма диплоидспецифической репарации. У клеток млекопитающих первичный выход ДР на  $D_0$  на геном одинаков в диапазоне  $L$  от 0,3 до 150 кэВ/мкм и составляет несколько десятков; большую часть таких ДР эти клетки при действии редкоизионизирующих излучений могут репарировать. При дальнейшем возрастании  $L$  выход ДР на  $D_0$  увеличивается. Область перегиба кривой  $/G \cdot D_0 \cdot \text{геном}/(L)$  соответствует максимуму радиочувствительности. В пике радиочувствительности репарация ДР замедлена или отсутствует, и данное число ДР, образующихся при прохождении частиц с данными  $L$ , является летальным.

Разная репарируемость ДР, образующихся при действии редкоизионизирующих излучений и тяжелых частиц, может свидетельствовать о качественных различиях первичных повреждений в том и другом случае: о преимущественном образовании ферментативных ДР из ОР при облучении клеток электромагнитными излучениями и прямых ДР - при действии тяжелых частиц. Поскольку ферментативные ДР активно репарируются, то пострадиационное восстановление наиболее эффективно осуществляется у клеток, облученных излучениями с малыми  $L$ . Можно думать, именно поэтому репарируемость лучевых повреждений уменьшается при увеличении количества энергии  $z_v$ , приходящейся на одно событие попадания в мишень объема  $v$ . Можно, следовательно, постулировать существование функции  $R(z_v)$ , которая связывает степень репарируемости элементарных мишеней с глубиной их поврежденности. Очевидно, что форма этой функции зависит от генотипа клеток.

Таким образом, биологическая эффективность излучений с разными  $L$  определяется двумя факторами: фактором физической природы  $z_v$ , который влияет на выход прямых ДР ДНК, трудно репарируемых клеткой, и фактором биологической природы  $R$ , генетически детерминированным и направленным на исправление, ликвидацию повреждений.

Авторы чрезвычайно признательны профессору Х.Абелю за обсуждение рукописи и ценные замечания.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов В.И., Лысцов В.Н. Основы микродозиметрии, Атомиздат, М., 1979.
2. Brustad T. In: Adv. in Biol. and Med. Physics, 1962, 8, p. 161-224.
3. Yaragai F., Takahashi T., Matsuyama A. J.Rad.Res., 1975, 16, p. 99-112.
4. Григорьев Ю.Г., и др. В кн.: Интеркосмос. Материалы симпозиума по космической биологии и медицине, Будапешт, 1970, с. 190-205.
5. Yatagai F., Takahashi T., Matsuyama A. J.Radiat.Res., 1975, 16, с. 99-112.
6. Munson R. et al. Int. J.Radiat.Biol., 1967, 13, p. 205-224.
7. Sayeg I. et al. Radiat Res., 1959, 10, p. 449-461.
8. Mortimer R., Brustad T., Cormack D.V. Radiat.Res., 1965, 26, p. 465-482.
9. Thacker J., Stretch A., Stephans M. Int.J.Radiat.Biol., 1979, 36, p. 137-148.
10. Todd P. Radiat. Res., 1975, 61, p. 288-297.
11. Ли Д.Е. Действие радиации на живые клетки. Атомиздат, М., 1963.
12. Timofeeff-Ressovsky N.V., Zimmer K.G. Das Trefferprinzip in der Biologie, - Leipzig, S.Hirzel, Vrl. 1947.
13. Циммер К.Г. Проблемы количественной радиобиологии. Госатомиздат, М., 1962.
14. Gunter K., Schulz W., Leistner W. Studia Biophysics, 1976, 60, p. 163-209.
15. Жестяников В.Д. Репарация ДНК и ее биологическое значение. "Наука", Л., 1979.
16. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. Радиобиология, 1981, 21, с. 3-7.
17. Hartwig M. Studia Biophysics, 1977, 66, p. 231.
18. Петров С.И. В кн.: Повреждение и репарация ДНК, Изд. Института биологической физики АН СССР, Пущино, 1980, с. 114-128.
19. Бреслер С.Е., Носкин Л.А. Радиобиология, 1978, 18, с.548-555.
20. Natarajan A.T. Obe J. Mut Res., 1978, 52, p. 137.
21. Scott D., Fox M., Fox B. Mut.Res., 1974, 22, p. 207-221.
22. Dewey W.C., Miller H.H., Leeper D.V. Proc.Nat.Acad.Sci., 1971, 68, с. 667.
23. Корогодина В.И., Гудкова Н.К., Близник К.М. Радиобиология, 1978, 18, с. 516-528.
24. Luchnik A.N., Glaser V.M., Shestakov S.V. Mol.Biol.Reps., 1977, 3, p. 437-442.

25. Корогодин В.И. и др. Радиобиология, 1977, 17, с. 700-710.
26. Kampf G., Tolkendorf E. *Studia Biophysica*, 1980, 78, p. 1-10.
27. Dugle S.L., Jillespie C.J., Chapman J.D. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1976, 73, p. 809-812.
28. Scott O.C.A. In: *Radiat. Effects in Phys., Chemist. and Biol.*, Amsterdam, 1963, p. 294-304.
29. Рыжов Н.И., Ворожцова С.В., Кощеева Л.А. В кн.: *Вопросы радиобиологии и биологического действия цитостатических препаратов*, Издательство Томского госуд. университета, Томск, 1970, т.3, с. 21-28.
30. Рыжов Н.И., Ворожцова С.В., Красавин Е.А. *Радиобиология*, 1980, 20, с. 373-379.
31. Cole A., et al. In: *Molecular mechanisms for repair of DNA*. 1975, No. p. 665-676.
32. Weibezahn, Sexauer C., Coquerelle T. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1980, p. 365-371.
33. Герасименко В.Н., Говорун Р.Д., Рыжов Н.И. *Радиобиология*, 1980, 20, с. 206-211.
34. Кудряшов Е.И. и др. В кн.: *Вопросы микродозиметрии. Труды первого Всесоюзного совещания по микродозиметрии*. Атомиздат, М., 1973, с. 49-55.
35. Buttes J.J., Katz R. *Radiat. Res.*, 1967, 30, p. 855-871.
36. Ковалев Е.Е., Сакович В.А. В кн.: *Вопросы микродозиметрии. Труды первого всесоюзного совещания по микродозиметрии*. Атомиздат, М., 1973, с. 17-29.
37. Berry R.J. *Radiat. Res.*, 1977, 70, p. 355-361.
38. Lehman A.R., Ormerod M.G. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 217, p. 268-277.
39. Krasin F., Hutchinson F. *J. Mol. Biol.*, 1977, 116, p. 81-98.
40. Бреслер С.Е., Вербенко В.Н., Калинин В.Л. *Генетика*, 1980, 16, с. 1753-1763.
41. Hariharan P.V., Hutchinson F. *J. Mol. Biol.*, 1973, 75, p. 479-494.

P

Корогодин В.И., Красавин Е.А. Факторы, определяющие различия P19-82-71 в биологической эффективности ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками

Рассматривается зависимость радиочувствительности ( $D_0^{-1}$ ) про- и эукариотических клеток от линейной передачи энергии /ЛПЭ/ излучений. Показано, что характер зависимости  $D_0^{-1}$  /ЛПЭ/ определяется не только физическими свойствами излучений, но и способностью клеток репарировать двуниевые разрывы /ДР/ ДНК. Увеличение радиочувствительности эукариотических клеток с ростом ЛПЭ связывается с уменьшением репаруемости ДР ДНК при действии плотноионизирующих частиц. Предполагается, что снижение репаруемости ДР обусловливается возрастанием выхода прямых ДР ДНК по сравнению с энзиматическими ДР при действии тяжелых частиц. Анализируются возможные модификации кривых  $D_0^{-1}$  /ЛПЭ/ для радиочувствительных и суперрезистентных мутантов.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1982

Korogodin V.I., Krasavin E.A. Factors Determinating Differences P19-82-71 in Biological Efficiency of Ionizing Radiations with Different Physical Characteristics

Radiosensitivity of pro- and eukariotes cells expressed by  $D_0^{-1}$  is considered in relation to the linear energy transfer (LET) of ionizing radiations. It is shown that the radiosensitivity as a function of LET  $D_0^{-1}$  (LET) is determined not only by physical characteristics of radiations but either by repair of double strand breaks (DSB) of DNA. An increase of radiosensitivity of eukariotes is connected with a decrease in the DSB repair when cells irradiated by heavy ions. A decrease in DSB repair is apparently connected are with an increase of straight DSB. Potential mechanisms of modification  $D_0^{-1}$ (LET) for radiosensitive and superresistant mutants are discussed.

The investigation has been performed at the Laboratory of the Nuclear Problems, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1982

Перевод О.С.Виноградовой.