

РАДИАЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И УСКОРЕННЫЕ ТЯЖЕЛЫЕ ИОНЫ

А.В. Борейко

Лаборатория радиационной биологии Объединенного института ядерных исследований, Дубна, Россия

e-mail: albor@jinr.ru

Резюме. Проведен анализ результатов экспериментальных исследований мутагенного действия ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на бактерии и клетки млекопитающих. Показано, что моноэнергетичные пучки ускоренных тяжёлых ионов являются эффективным инструментом установления механизмов образования генных и структурных мутаций у клеток с различным генотипом.

Ключевые слова: генные и структурные мутации, ускоренные тяжёлые ионы, повреждения ДНК.

RADIATION MUTAGENESIS AND ACCELERATED HEAVY IONS

A.V. Boreyko

Radiation Biology Laboratory of the Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

e-mail: albor@jinr.ru

Summary. An analysis of the results of experimental studies of the mutagenic effect of ionizing radiation with different physical characteristics on bacteria and mammalian cells has been carried out. It has been shown that monoenergetic beams of accelerated heavy ions are an effective tool for establishing the mechanisms for formation of gene and structural mutations in cells with different genotypes.

Key words: gene and structural mutations, accelerated heavy ions, DNA damage.

Уже в первые десятилетия прошлого века стало ясно, что ионизирующие излучения с разными физическими характеристиками являются эффективным инструментом при выяснении механизмов действия излучения на живые клетки и, прежде всего, механизмов радиационного мутагенеза. Со всей определённостью на это указывали классики радиационной генетики. Н.В. Тимофеев-Ресовский отмечал: «Опыты с излучениями разных мощностей дозы и разной жесткости позволили в значительной мере конкретизировать то физическое явление, которое служит физическим механизмом, вызывающим мутации...». Открытие структуры ДНК Дж. Уотсоном и Ф. Криком семьдесят лет назад революционизировало не только мутационные исследования, но и всю генетику и почти всю биологию. Вместе с тем потребовалось несколько лет, чтобы двойная спираль стала общепризнанной как истинная структура генетического материала. С принятием предложенной модели гена, центральная проблема мутагенеза была решена раз и навсегда. Открытие молекулярной структуры гена позволило конкретизировать характер молекулярных нарушений, возникающих при облучении живых клеток и являющихся основой формирования мутаций. Однако однозначная связь конкретных молекулярных нарушений структуры ДНК, таких как одонитевые разрывы нити ДНК, модифицированные основания, с их проявлением в виде закреплённой мутации не находила подкрепления. Это обстоятельство позволило рассматривать определённые повреждения ДНК как «премутационные» и прийти к выводу о вероятностном характере закрепления повреждения в генетической структуре в виде мутации.

Среди широкого спектра радиационных повреждений ДНК (нарушения сахарофосфатного остова, модификации оснований, разного рода шивки и т. д) позднее были идентифицированы «кластерные повреждения». Такого рода нарушения структуры включают в себя несколько соседних «одиночных» повреждений ДНК в одной или

двух оппозитных нитях ДНК. С увеличением линейной передачи энергии (ЛПЭ) излучений возрастает выход таких повреждений, формирующихся вдоль трека заряженных частиц. Возрастает и количество генных и структурных мутаций в облученных клетках. Это обстоятельство позволило прийти к выводу о важной роли кластерных повреждений ДНК в индуцированном мутационном процессе. С использованием пучков ускоренных заряженных частиц, генерируемых ускорителями тяжёлых ионов в ОИЯИ, были изучены закономерности формирования генных и структурных мутаций в клетках микроорганизмов, млекопитающих и человека в широком диапазоне ЛПЭ. С применением методов микродозиметрии было установлено, что выход (G) различных комбинаций повреждений, входящих в кластерные нарушения структуры одной или оппозитных участков двух нитей ДНК, возрастает с увеличением ЛПЭ частиц, достигая максимальных значений [1]. При этом, положение максимума на зависимости G(ЛПЭ) для различных типов кластерных повреждений не является инвариантным. Для «однонитевых» кластерных повреждений их максимальный выход выявляется в области ЛПЭ частиц значительно меньших по сравнению с «двунитевыми» повреждениями. С учетом этих обстоятельств были изучены закономерности формирования генных и структурных мутаций у бактерий в широком диапазоне ЛПЭ. Было установлено, что закономерности индукции генных и структурных мутаций в клетках бактерий при действии излучений широкого диапазона ЛПЭ, различны [2]. Это обусловлено различием в характере радиационных повреждений ДНК, вовлекаемых в мутационный процесс: кластерных однонитевых разрывов и двунитевых разрывов ДНК при формировании генных и структурных мутаций, соответственно. Показано, что дозовые зависимости частоты образования генных мутаций при действии γ -квантов и ускоренных тяжёлых ионов описываются линейно-квадратичными функциями, для структурных мутаций характерны линейные зависимости «доза-эффект». Квадратичный характер дозовых кривых мутагенеза обусловлен «взаимодействием» двух независимых друг от друга событий «попадания» в ходе SOS-репарации повреждений генетических структур. Сделан вывод о том, что при действии ускоренных тяжёлых ионов генные мутации индуцируются областью δ -электронов треков заряженных частиц. Методами SOS-хромотеста, SOS-люкс-теста и индукции профага λ изучены закономерности SOS-ответа клеток при действии излучений в широком диапазоне ЛПЭ [3, 4]. На основании полученных данных с использованием тяжёлых ионов сделан вывод о том, что молекулярной основой формирования генных мутаций являются кластерные однонитевые разрывы ДНК, структурных мутаций – двунитевые разрывы ДНК. Выявлено, что зависимость относительной биологической эффективности (ОБЭ) ускоренных ионов от их ЛПЭ описывается кривыми с локальным максимумом. Показано, что биологическая эффективность ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки с различным генотипом, оцениваемая по летальному действию, индукции генных и структурных мутаций, детерминирована особенностями передачи энергии излучений, влияющими на характер индуцируемых повреждений ДНК, и эффективностью работы индуцибельных и конститутивных систем репарации клеток. Возрастание относительной биологической эффективности тяжелых заряженных частиц обусловлено увеличением выхода повреждений ДНК, участвующих в формировании радиационно-индуцированных эффектов, и повышением эффективности индуцибельных систем репарации. Установлено, что величина ЛПЭ (L_{max}), при которой наблюдаются максимальные значения коэффициентов ОБЭ по использованным критериям облучения, варьирует в зависимости от характера регистрируемого радиационно-индуцированного эффекта. Показано, что для генных мутаций значения L_{max} реализуются в области ЛПЭ, равных ≈ 20 кэВ/мкм. Для летальных эффектов

облучения и индукции делеционных мутаций величина L_{\max} составляет ≈ 50 и 100 кэВ/мкм, соответственно. Различия в положении L_{\max} для изученных радиационно-генетических эффектов определяются различным типом повреждений ДНК, участвующих в мутационном процессе [2].

Исследования мутагенных эффектов облучения клеток млекопитающих и человека тяжёлыми заряженными частицами также выявили высокую биологическую эффективность ускоренных многозарядных ионов [5]. Были изучены закономерности индукции разными типами излучений нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций в клетках человека. При исследовании стабильных хромосомных aberrаций были использованы ДНК-пробы, специфичные для хромосом 1 и 2 лимфоцитов человека. С применением FISH-техники выявлена высокая частота образования стабильных aberrаций хромосом, таких как транслокации.

Как уже указывалось, 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, какими являются двунитевые разрывы (ДР) ДНК. Пересечение тяжёлой заряженной частицей участка ДНК приводит к нарушению целостности не только двух комплементарных нитей ДНК, но при этом повреждаются и другие молекулярные структуры, прилегающие к данному сайту. Такие кластерные повреждения наиболее трудны для репарации восстановительными системами клеток. Они являются молекулярным субстратом клеточной гибели, образования различного рода мутаций хромосом, злокачественной трансформации. Очевидна необходимость тщательного исследования закономерностей и механизмов формирования и репарации такого рода повреждений. С этой целью в нашей лаборатории были предприняты исследования индукции и репарации двунитевых разрывов ДНК в клетках человека при действии излучений с разными физическими характеристиками. Для этого были использованы эффективные современные методы, позволяющие проводить изучение формирования ДР ДНК в ядрах отдельных клеток: метод иммуноцитохимического окрашивания клеток при помощи конъюгированных с разными флуоресцентными красителями антител специфичных к белкам (метод ДНК-фокусов).

С использованием метода иммуноцитохимического окрашивания и конфокальной микроскопии была изучена кинетика формирования и элиминации радиационно-индуцированных γ H2AX/53BP1 фокусов в ядрах фибробластов при действии γ -квантов ^{60}Co и ускоренных ионов ^{11}B [6]. Было продемонстрировано, что при действии ускоренных ионов ^{11}B в фибробластах человека формируется больше γ H2AX/53BP1 фокусов, чем при действии γ -квантов ^{60}Co . Было установлено, что в пострадиационный период элиминация радиационно-индуцированных фокусов при действии тяжёлых ионов замедлена по сравнению с γ -облученными клетками. Это обстоятельство свидетельствует о формировании более сложных, кластерных повреждений ДНК, индуцированных ускоренными ионами.

Таким образом, использование моноэнергетичных заряженных частиц в радиационно-генетических исследованиях позволило установить, что биологическая эффективность ионизирующих излучений с разными физическими характеристиками на клетки с различным генотипом, оцениваемая по индукции генных и структурных мутаций, детерминирована двумя факторами различной природы: физическим фактором, определяющим особенностями передачи энергии излучений и влияющим на характер индуцируемых повреждений ДНК, и биологическим - эффективностью работы индуцибельных и конститутивных систем репарации повреждений

генетических структур клеток. Роль биологического фактора является зависимой от ЛПЭ излучений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michalik V. Model of DNA damage induced by radiations of various qualities // *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, V.62, p.9-20.
2. Boreyko A.V., Krasavin E. A. Mutagenic effect of accelerated heavy ions on bacterial cells. "Physics of Particles and Nuclei", 2011, V. 42, No 6, p. 998-1024
3. Красавин Е.А., Козубек С. Мутагенное действие излучений с разной ЛПЭ. М.: Энергоатомиздат, 1991
4. Комова О.В., Красавин Е.А. Закономерности SOS-ответа в клетках *E. coli* при действии плотниоизирующих излучений. Труды IV съезда по радиационным исследованиям (всероссийский) Москва, Изд-во Росс. ун-та. дружбы народов, т. III, 2001, с.7-22.
5. Говорун Р.Д., Шмакова Н.Л., Кошлань И.В. и др. Генетическое действие излучений с разными физическими характеристиками на клетки млекопитающих и человека. Физика элементарных частиц и атомного ядра (ЭЧАЯ), т.35. № 6, 2004, с. 1483 – 1511.
6. Jezkova L. et al. Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: a high-resolution microscopy analysis of YH2AX/53BP1 foci. *Nanoscale*, DOI: 10.1039/c7nr06829h.