

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

19-82-837

28/11-83

Х.Абель, Г.Эрцгребер, К.Айхорн*, Г.Кампф*,
Э.Толькендорф*

ДВУХНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК
И ИНАКТИВАЦИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛПЭ ИЗЛУЧЕНИЙ.
ЭКСПЕРИМЕНТ И ТЕОРИЯ

Направлено в журнал "Радиобиология"

* Центральный институт молекулярной биологии
АН ГДР.

1982

К.Гюнтером и В.Шульцем была предложена полуэмпирическая теория лучевой инактивации клеток млекопитающих^{/1/}. Преимущество этой теории по сравнению с другими заключается в том, что она позволяет предсказывать /путем расчета/ кривые выживания клеток млекопитающих для любого вида излучения, используя экспериментально полученные кривые "доза-эффект" для рентгеновых или γ -лучей.

Методика расчета заключается в следующем:

Экспериментальная кривая выживания для рентгеновых или γ -лучей описывается с помощью суммы экспоненциальных функций:

$$S(D) = \sum_{\mu=1}^n B_{\mu} e^{-a_{\mu}^{(0)} D}, \quad \sum_{\mu=1}^n B_{\mu} = 1, \quad /1/$$

где S - выживаемость клеток в зависимости от дозы излучения D , B_{μ} и $a_{\mu}^{(0)}$ - коэффициенты.

Пользуясь кривой выживания клеток для рентгеновых лучей, можно определить B_{μ} и $a_{\mu}^{(0)}$. Аналогично в виде суммы экспоненциальных функций с теми же значениями B_{μ} , но с другими a_{μ} может быть представлена кривая выживания для любого другого вида излучения:

$$S(D) = \sum_{\mu=1}^n B_{\mu} e^{-a_{\mu} D}. \quad /2/$$

Согласно /1/ $a_{\mu}^{(0)}$ и a_{μ} выражаются следующим соотношением:

$$a_{\mu} = \frac{1}{\bar{z}_F} \int_0^{\infty} dz (1 - e^{-r a_{\mu}^{(0)} z}) f_1(z), \quad /3/$$

где \bar{z}_F - среднее значение частоты событий поглощения энергии z в ядре клеток, а f_1 - вероятность того, что одна частица при попадании в ядро передает ему энергию z . Значения \bar{z}_F и f_1 можно определить методами микродозиметрии.

В случае значений энергии частиц в несколько МэВ/нуклон /как в данной работе/ и диаметра ядра клеток порядка нескольких мкм можно пренебречь долей непрямых событий абсорбции и рассеянием энергии при прохождении ионов^{/2/}. Следовательно, для $f_1(z)$ можно принять треугольное распределение, а для ЛПЭ - среднее значение в уравнении /3/. Из /3/ следует:

$$a_{\mu} = \frac{0,0624\sigma_0}{LET_{\infty}} \left[1 - 2 \frac{1 - (1+x)e^{-x}}{x^2} \right], \quad x = \frac{r a_{\mu}^{(0)} LET_{\infty}}{0,0416\sigma_0}, \quad /4/$$

где ЛПЭ выражено в кэВ/мкм, а сечение клеточного ядра σ_0 - в мкм². Параметр γ описывает относительную эффективность исследуемого вида излучения по сравнению со "стандартными" рентгеновыми лучами для возникновения таких повреждений ДНК, которые приводят к инактивации клетки. $\alpha_{\mu}^{(0)}$ и α_{μ} характеризуют вклад физического фактора в повреждение ДНК, а V_{μ} отражает реакцию живой клетки на эти повреждения и является независимым от вида частиц. Значение V_{μ} , следовательно, можно рассчитать, располагая кривой выживания данных клеток при действии рентгеновых лучей.

В теории Гюнтера и Шульца прежде всего остается открытым вопрос о том, какие именно повреждения ДНК ответственны за инактивацию клеток, то есть выход каких повреждений ДНК обуславливает величину параметра γ . Если известен тип молекулярных повреждений ДНК, приводящих к гибели клетки, и зависимость параметра γ от вида излучения, тогда в уравнениях /3/ и /4/ известны все параметры и кривые выживания клеток при действии любого вида частиц можно рассчитать, располагая только кривой выживания при действии рентгеновых лучей. Поэтому теорию Гюнтера и Шульца можно использовать также для оценки возможного вклада в гибель клеток разных типов повреждений ДНК. Имеется много данных, свидетельствующих о том, что такими событиями, обуславливающими гибель облученных клеток, являются двухнитевые разрывы ДНК. В настоящей работе приведены результаты определения зависимости выживаемости клеток китайского хомяка и величины параметра γ от дозы рентгеновых лучей, дейтронов, α -частиц и ионов C^{12} , а также предпринято сравнение экспериментальных данных с теоретическими, рассчитанными по уравнениям /3/ и /2/.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Культивирование клеток

Клетки китайского хомяка линии V79-4 культивировали в виде монослоя в питательной среде Eagle MEM с 20% сыворотки крови теленка. Клетки в экспоненциальной фазе роста трипсинизировали /0,01 М EDTA и 0,25% трипсин/, суспендировали в свежей среде и облучали при комнатной температуре.

Долю выживших клеток определяли по методу Пака. Эффективность роста в разных опытах варьировалась в пределах от 60 до 95%.

1.2. Облучение клеток

Рентгеновыми лучами клетки облучали в стеклянных пробирках; дозиметрию осуществляли химическим дозиметром по Фрикке. Суспензии клеток подвергались воздействию дейтронов и α -частиц на циклотроне У-120 в Россендорфе с помощью специального устройства, описанного ранее^{/3/}. Оно состоит из стеклянного шприца с соплом

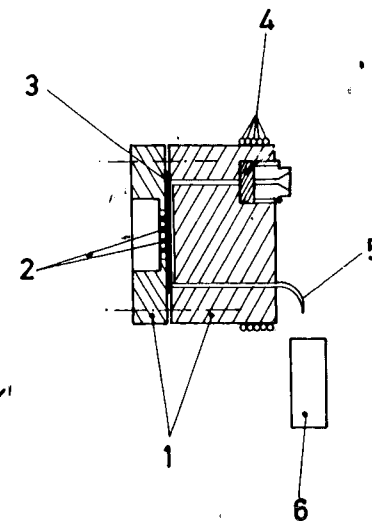


Рис. 1. Схема камеры для облучения клеток заряженными частицами. Пояснение в тексте.

диаметра 170 мкм, через которое суспензия клеток проходит со скоростью 3 м/с и движется перпендикулярно к пучку частиц. Облучение проводили в постоянном режиме.

Для экспериментов в импульсном режиме на ускорителях в ОИЯИ применяли камеру, схема которой представлена на рис. 1. В цилиндрической блоке /1/ из нержавеющей стали за опорной решеткой /2/ находится фольга из слюды /3/, за которой имеется паз шириной 4 мм и глубиной 80 мкм. Через паз раствор вертикально пере-

секает пучок частиц и стекает через трубку /5/ в улавливающий сосуд /6/. Эта камера предупреждает попадание в культуру инфекции и позволяет проводить облучение в гипоксических условиях. Скорость потока суспензии, равная примерно 10^{-2} мл/с, достаточно мала для работы с импульсным пучком длительностью 20 мс. Дозиметрия осуществлялась ионизационной камерой, описанной ранее^{/4/}.

1.3. Определение двухнитевых разрывов ДНК

Для определения двухнитевых разрывов ДНК клетки в течение 18 часов метили ³H-тимидином /5мКи/мл/. После облучения суспензию клеток в количестве 0,1 мл замораживали с помощью азота и сохраняли в таком виде до обработки. Перед центрифугированием замороженные образцы размещали на поверхности лизирующего раствора на градиенте 5-20% сахарозы. Лизис клеток осуществлялся в течение часа в темноте. Пробы центрифугировали 17-24 часов /в зависимости от дозы облучения/ в ультрацентрифуге VAC-602 с ротором "Swingout" со скоростью 9000 оборотов в минуту.

Анализ полученных профилей седиментации осуществляли с помощью счетной программы. Долю двухнитевых разрывов ДНК (s) рассчитывали по уравнению

$$s = \frac{\Delta \frac{1}{M_n}}{\Delta D}, \quad /5/$$

где D - доза в Гр и M_n - среднечисленное значение молекулярного веса. Более подробно методика описана в^{/5/}.

* При необходимости можно охлаждать суспензию клеток /4/.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены экспериментально полученные данные по выходу двухнитевых разрывов ДНК и рассчитанные значения параметра γ .

Таблица 1

Выход двухнитевых разрывов ДНК в зависимости от ЛПЭ излучений

Вид излучения	ЛПЭ, кэВ/мкм	Выход двухнитевых разрывов ДНК /Гр · дальтон/ ⁻¹	γ
рентгеновы лучи	2,5	$3,3 \cdot 10^{-12}$	1,0
дейтроны	7,35	$4,6 \cdot 10^{-12}$	1,4
α -частицы	32,0	$6,8 \cdot 10^{-12}$	2,1
ионы C^{12}	360,0	$5,9 \cdot 10^{-12}$	1,8

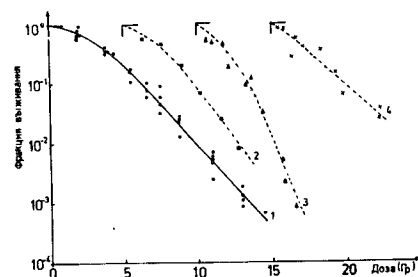


Рис. 2. Кривые выживания клеток китайского хомяка V79-4 при действии разных типов излучений. 1 - рентгеновы лучи; 2 - дейтроны; 3 - α -частицы; 4 - ионы C^{12} .

На рис. 2 отдельными значками изображены полученные значения эксперимента по выживаемости клеток после воздействия излучений, представленных в табл. 1. Сплошной линией показана кривая выживания $S(D) = \sum_{\mu=1}^5 B_{\mu} e^{-\alpha_{\mu} D}$ для рентгеновых лучей, рассчитанная для тех значений параметров B_{μ} и $\alpha_{\mu}^{(0)}$, которые приведены в табл. 2.

Параметры кривой выживания для рентгеновых лучей

Таблица 2

μ	B_{μ}^*	$\alpha_{\mu}^{(0)*}$
1	7,17	0,00658
2	-22,177	0,01158
3	28,604	0,01525
4	-16,021	0,01893
5	3,422	0,02260

* Для расчета этих параметров из кривой рентгеновых лучей Гюнтер и Шульц разработали простую графическую методику /6/.

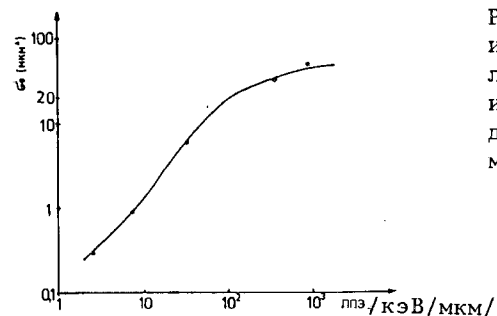


Рис. 3. Зависимость сечения инактивации σ_0 от ЛПЭ излучения. Ось абсцисс - ЛПЭ излучений, кэВ/мкм; ось ординат - сечение инактивации, $мкм^2$.

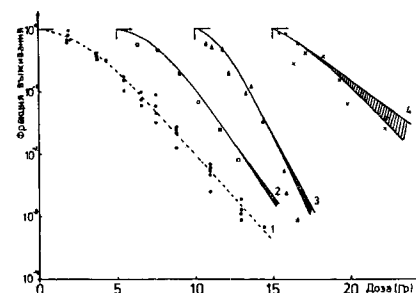


Рис. 4. Теоретические кривые выживаемости для диаметра клеточного ядра $\sigma_0 = 40 мкм^2$ /меньший наклон/ и $\sigma_0 = 60 мкм^2$ /большой наклон/; значками показаны те же данные, что на рис. 2. 1 - рентгеновы лучи; 2 - дейтроны; 3 - α -частицы; 4 - C^{12} -ионы. Ось абсцисс - доза, Гр; ось ординат - доля выживших клеток.

Для перерасчета значений $\alpha_{\mu}^{(0)}$ в значения α_{μ} для разных видов частиц по уравнению /4/ должно быть известно сечение клеточного ядра σ_0 . Его определение для клеточной культуры в суспензии затруднено. Для этой цели были поставлены эксперименты по определению кривой выживания клеток, облученных частицами Ne^{22} с ЛПЭ 890 кэВ/мкм. Из конечных наклонов D_0^{-1} семейства кривых получили сечение инактивации $\sigma_0 = 16 LET_{\infty} D_0^{-1}$, зависимость которого от ЛПЭ представлена на рис. 3. Из этих результатов видно, что величина сечения равна примерно $60 мкм^2$. Для σ_0 со значениями 40 и $60 мкм^2$ величину α_{μ} рассчитали по уравнению /4/, а кривые выживания - по уравнению /2/.

На рис. 4 приведены рассчитанные кривые выживания и экспериментальные значения выживаемости клеток, облученных заряженными частицами. Наилучшее соответствие расчетных кривых и экспериментальных данных получено для клеток с сечением ядра $\sigma_0 = 60 мкм^2$. Эти данные показывают, что полуэмпирическая теория Гюнтера и Шульца со значениями γ для двухнитевых разрывов ДНК позволяет вполне удовлетворительно предсказывать характер кривых выживаемости клеток для излучений с разной ЛПЭ. Это означает, что инактивация деления клеток определяется образованием двухнитевых разрывов ДНК,

а другими видами повреждений в пределах точности эксперимента можно пренебречь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guenther K., Schulz W. Europ. J. Cancer, Suppl., 1979, pp. 196-198.
2. Kellerer A.M., Rossi H.H. Radiat Research, 1978, 75, p. 471.
3. Erzgraeber G., Eichhorn K. studia biophysica, 1971, 27, pp. 47-50.
4. Eichhorn K. Physikalische Grundlagen zur Strahlenbiologie mit beschleunigten leichten und schweren Kernen, Dissertation, AdW der DDR Berlin, 1980.
5. Kampf G. et al. studia biophysica, 1977, 62, pp. 17-24.
6. Guenther K., Schulz W. Biophysical theory of radiation action. A treatise of relative biological effectiveness. Akademie-verlag Berlin, 1982.

Рукопись поступила в издательский отдел
8 декабря 1982 года.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

D3-11787	Труды III Международной школы по нейтронной физике. Алушта, 1978.	3 р. 00 к.
D13-11807	Труды III Международного совещания по пропорциональным и дрейфовым камерам. Дубна, 1978.	6 р. 00 к.
D1,2-12036	Труды VI Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1978 /2 тома/	7 р. 40 к.
D1,2-12450	Труды V Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1978.	5 р. 00 к.
D1,2-12450	Труды XII Международной школы молодых ученых по физике высоких энергий. Приморско, НРБ, 1978.	3 р. 00 к.
D11-80-13	Труды VII Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1980 /2 тома/	8 р. 00 к.
D4-80-271	Труды рабочего совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике, Дубна, 1979	3 р. 50 к.
D4-80-385	Труды Международной конференции по проблемам нескольких тел в ядерной физике. Дубна, 1979.	3 р. 00 к.
D2-81-543	Труды Международной школы по структуре ядра. Алушта, 1980.	5 р. 00 к.
D10,11-81-622	Труды VI Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1981	2 р. 50 к.
D1,2-81-728	Труды Международного совещания по проблемам математического моделирования в ядерно-физических исследованиях. Дубна, 1980	2 р. 50 к.
D17-81-758	Труды VI Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 60 к.
D1,2-82-27	Труды II Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1981.	5 р. 40 к.
P18-82-117	Труды Международного симпозиума по поляризационным явлениям в физике высоких энергий. Дубна, 1981.	3 р. 20 к.
D2-82-568	Труды IV совещания по использованию новых ядерно-физических методов для решения научно-технических и народнохозяйственных задач. Дубна, 1981.	3 р. 80 к.
D9-82-664	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
D3,4-82-704	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
D3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

**ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ
ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

<p>Абель Х. и др. Двухнитевые разрывы ДНК и инактивация клеток млекопитающих в зависимости от ЛПЭ излучений. Эксперимент и теория</p> <p>Полуэмпирическая теория инактивации клеток млекопитающих разными видами ионизирующих излучений, созданная Гюнтером и Шульцем^{/1/}, содержит только один неопределенный параметр r, который равен относительному числу повреждений ДНК, ответственных за инактивацию клеток, при одинаковых дозах исследуемого вида излучения и рентгеновых лучей. Следовательно, данная теория позволяет экспериментально проверить, какой тип повреждения ДНК описывается параметром r.</p> <p>В настоящей работе с использованием клеток китайского хомяка V79-4 в параллельных опытах определялись параметр r для двухнитевых разрывов и выживаемость клеток после воздействия разных видов излучений. Кривые выживания, рассчитанные на основании этого параметра r, хорошо согласуются с экспериментальными кривыми выживания. Полученные результаты подтверждают предположение, что двухнитевые разрывы ДНК являются событиями, лежащими в основе детального действия ионизирующих излучений.</p> <p>Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.</p> <p style="text-align: right;">Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1982</p>	19-82-837
<p>Abel H. et al. Double Strand Breaks in DNA and Inactivation of Cells in Dependence from LET of Irradiation. Experiment and Theory</p> <p>The theory developed by Günther and Schulz describes the inactivation of cells and contains only one free parameter: the relative frequency r of DNA-lesion, which is responsible for inactivation. Thereby the theory offers a possibility to test, whether with r for DNA double strand breaks the theoretical prediction of the survival of cells corresponds to the experimental reality.</p> <p>We exposed Chinese hamster cells of the strain V79-4 to the radiation of different quality and determined the survival and r for DNA double strand breaks. Using then the r-values we calculated the survival rate of cells and obtained a good conformity to the experimental values. This result verifies the assumption, that the DNA double strand breaks are the main source of cell inactivation.</p> <p>The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Problems, JINR.</p> <p style="text-align: right;">Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1982</p>	19-82-837