

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-86-416

Р.Д.Говорун, Е.А.Насонова, Е.А.Красавин,
С.Козубек, А.П.Череватенко

ЛЕТАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ
УСКОРЕННЫХ ТЯЖЕЛЫХ ИОНОВ
НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ
В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ИНГИБИТОРОВ
СИНТЕЗА ДНК

Результаты экспериментальных исследований

Направлено в журнал "Радиобиология"

1986

В настоящее время становится все более очевидным, что возникновение двунитевых разрывов /ДР/ ДНК играет решающую роль в летальном действии ионизирующих излучений разного качества на клетки про- и эукариот^{/1,2/}. В исследованиях на бактериях *Escherichia coli* было показано^{/3,4/}, что при γ -облучении клеток в процессе эксцизионной репарации фермент-лабильных участков образуются энзиматические ДР /ЭДР/ ДНК. Излучения с высокой линейной передачей энергии (L) индуцируют, главным образом, прямые ДР /ПДР/ ДНК^{/5,6/}. С использованием ингибиторов синтеза ДНК - арабинозидцитозина /АраЦ/ и оксимочевины /ОМ/ выяснено, что при γ -облучении и у клеток млекопитающих возникает ЭДР ДНК^{/7/}. Повышение выхода ЭДР ДНК в присутствии АраЦ + ОМ приводит к возрастанию чувствительности клеток к γ -облучению в ~2 раза. Ранее нами было показано^{/8/}, что при действии ускоренных ионов углерода в отличие от γ -облучения сенсibiliзирующего влияния АраЦ + ОМ на клетки китайского хомячка не наблюдается, что, по-видимому, связано с возникновением в этом случае ПДР ДНК.

Описание летальных эффектов излучений, различающихся по L, наиболее полно дает теория Гюнтера - Шульца^{/9/}, основывающаяся на идентичном характере ДР ДНК при γ -облучении и действии тяжелых ионов. Однако данные о важной роли ЭДР ДНК в летальном действии излучений с низкой L на клетки указывают на необходимость пересмотра концепций, интерпретирующих характер зависимости относительной биологической эффективности /ОБЭ/ от L лишь на основе учета микродозиметрических характеристик излучений при их действии на генетические структуры клеток. Показано, что не менее важная роль в зависимости ОБЭ от L принадлежит биологическим особенностям клеток и, в частности, их способности к репарации лучевых повреждений^{/4,7/}. Исходя из этого представляется, что на основе подходов, развитых в^{/9/}, невозможно описать летальные эффекты разных типов излучений на клетки при облучении их в стандартных условиях и при действии на них агентов, влияющих на выход ЭДР ДНК. Для оценки влияния факторов физической и биологической природы на чувствительность клеток млекопитающих к действию излучений и было выполнено настоящее исследование.

В первой части работы представлены результаты экспериментальных исследований влияния ингибиторов синтеза ДНК на чувствительность клеток китайского хомячка к действию излучений с разной L, во второй - теоретический анализ полученных результатов в рамках концепции Гюнтера - Шульца и с позиций разработанных нами представлений.

МЕТОДИКА

В исследованиях использовали клетки китайского хомячка V79-4. Культивирование проводили в соответствии с общепринятой методикой. Выращивание и подготовка клеток для облучения описаны ранее^{/8/}. Арабинозидцитозин (2, 2' anhydro 1-D-arabinofuranosylcytosine·HCl) производства фирмы "Serva" /ФРГ/ и оксимочевину /синтезирована в ЛИЯФ АН СССР/ добавляли в питательную среду в концентрации 0,1 и 4 мМ/мл соответственно за 30-40 мин до облучения. Через 1,5-2 ч после облучения клетки промывали свежей средой, трипсинизировали и высевали в чашки Петри для оценки выживаемости. Через 8-9 суток просчитывали число выросших колоний.

Таблица 1

Физические характеристики излучений

Вид излучения	Энергия, МэВ/нуклон	L, кэВ/мкм	Интервал доз облучения, Гр	Мощность дозы, Гр/мин
γ -кванты ^{137}Cs	0,667 МэВ	0,3	I - I3	4,6
^4He	$7,9 \pm 0,2$	$22 \pm 0,2$	0,5 - 6	20
^4He	$2,2 \pm 0,3$	60 ± 5	I - 4,5	20
^{12}C	$6,6 \pm 0,2$	231 ± 4	0,5 - 4,5	I2
^{20}Ne	$5,8 \pm 0,2$	690 ± 20	I - 7	63

Клетки облучали γ -квантами ^{137}Cs и ускоренными тяжелыми ионами, источником которых являлся ускоритель У-200 Объединенного института ядерных исследований. Монослой клеток облучали через поликарбонатную пленку /толщина 8 мкм/, на которой они росли, ионами гелия, углерода и неона. Физические характеристики использованных видов излучений представлены в табл.1. Приведенные значения энергий ионов и соответствующие им L являются средневзвешенными по энергетическому спектру ионов, падающих на клетки. Полуширина на полувысоте этих распределений дана как ошибка при соответствующих средневзвешенных значениях L. Методическая неопределенность в оценке L и поглощенной дозы, связанная с расчетом L-распределений по измеренному энергетическому спектру /при использовании модифицированной программы STOPOW^{/10/}, с калибровкой ионизационного монитора и полупроводникового спектрометра, оценивается нами в 8-10%. Облучение проводили

с помощью специально созданной установки с комплексом электронно-физической аппаратуры.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на ЭВМ с использованием методов, описанных нами ранее^{/11/}.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 представлены кривые выживания (S) в зависимости от дозы (D) облучения γ -квантами ^{137}Cs и ускоренными тяжелыми ионами в стандартных условиях и в условиях влияния АраЦ + ОМ. Можно видеть, что форма кривых выживания при облучении клеток излучениями разного качества в обоих случаях одинакова. Зависимости S(D) при γ -облучении и действии ионов ^4He с L=22 кэВ/мкм являются сигмоидными. При облучении тяжелыми ионами с более высокими значениями L наблюдается экспоненциальный тип зависимости S(D).

Инкубация облученных клеток в среде, содержащей АраЦ + ОМ, оказывает сенсibiliзирующее влияние на выживаемость клеток после γ -облучения /рис.1/. Вследствие этого увеличивается угол наклона экспоненциального участка кривой выживания. Величина фактора изменения дозы /ФИД/ в этом случае составляет $1,67 \pm 0,05$ /табл.2/. Модифицирующее влияние указанных агентов наблюдается также и при действии ионов гелия, однако значения ФИД существенно меньше. При действии на клетки ионов ^{12}C и ^{20}Ne с более высокими значениями L модифицирующее влияние ингибиторов синтеза ДНК полностью отсутствует.

Хорошо известно, что зависимость радиочувствительности (D_0^{-1}) клеток высших эукариот от L описывается кривой с максимумом, приходящимся на значения L=100-200 кэВ/мкм^{/12-16/}. Как видно из рис.2, и в наших экспериментах радиочувствительность клеток возрастает с увеличением L при значениях L < 100 кэВ/мкм и уменьшается при дальнейшем увеличении L > 200 кэВ/мкм. При облучении использованными видами излучений как в стандартных условиях, так и в условиях влияния АраЦ + ОМ, зависимости D_0^{-1} (L) описываются кривыми с максимумом, однако в последнем случае величина его меньше, что обусловлено повышением чувствительности клеток к γ -облучению в условиях действия ингибиторов синтеза ДНК.

Ранее мы указывали^{/8/} на то, что отсутствие модифицирующего действия АраЦ + ОМ на клетки китайского хомячка при облучении тяжелыми ионами можно объяснить повышением выхода ПДР ДНК. Установлено^{/7/}, что механизм сенсibiliзирующего влияния АраЦ + ОМ на клетки млекопитающих при γ -облучении заключается в подавлении репарации коротких /~100 нуклеотидов/ одностранных брешей, что приводит к повышению вероятности повреждения опозитных этим брешам участков одностранный ДНК специфическими ν_1 -эндонуклеазами. В результате этого возникают ЭДР ДНК. Повышение выхода ДР ДНК

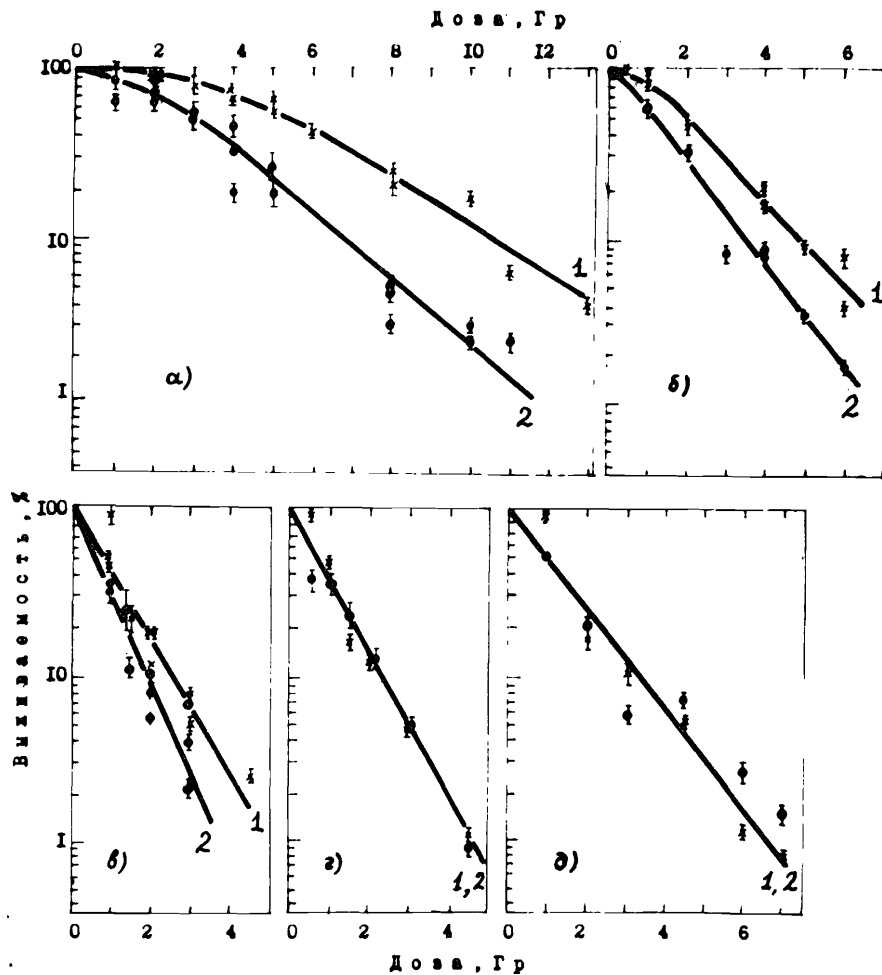


Рис.1. Влияние арабинозидцитозина и оксимочевины на выживаемость клеток китайского хомячка при γ -облучении /а/ и действии ускоренных тяжелых ионов: ${}^4\text{He}$ с $L = 22$ кэВ/мкм /б/, ${}^4\text{He}$ с $L = 60$ кэВ/мкм /в/, ${}^{12}\text{C}$ /г/ и ${}^{20}\text{Ne}$ /д/. 1 - в стандартных условиях, 2 - в присутствии АраЦ + ОМ.

в клетках млекопитающих, облученных редкоизирующими излучениями, при инкубации в среде с АраЦ или сходным по своему действию ингибитором синтеза ДНК - β -арабинофуранозиладенином /АраА/ отмечали также другие авторы^{/17-18/}. Отсутствие модифицирующего влияния ингибиторов синтеза ДНК на клетки млекопитающих при действии излучений с высокой L показано в^{/19/}. При облучении клеток асцитной карциномы Эрлиха ускоренными ионами урана с энергией 6,5 МэВ/нуклон влияния АраА на клетки не было обнаружено.

Таблица 2

Влияние арабинозидцитозина и оксимочевины на чувствительность клеток китайского хомячка V 79 к γ -облучению и действию ускоренных тяжелых ионов

Вид излучения	Стандартные условия				АраЦ+ОМ				ФИЦ
	D_{0}^{-1}	n	ОБЭ	D_{0}^{-1}	n	ОБЭ	ФИЦ		
γ -кванты ${}^{137}\text{Cs}$ ${}^4\text{He}$ ${}^4\text{He}$ ${}^{12}\text{C}$ ${}^{20}\text{Ne}$	$0,33 \pm 0,01$	3,5	I	$0,55 \pm 0,02$	3,5	I	$1,67 \pm 0,05$		
	$0,62 \pm 0,03$	2	$1,88 \pm 0,06$	$0,79 \pm 0,04$	2	$1,44 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,07$		
	$1,01 \pm 0,03$	1,2	$3,06 \pm 0,04$	$1,23 \pm 0,09$	1,2	$2,24 \pm 0,08$	$1,22 \pm 0,08$		
	$1,02 \pm 0,03$	I	$3,09 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,06$	I	$1,87 \pm 0,07$	$1,01 \pm 0,07$		
	$0,71 \pm 0,05$	I	$2,15 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,15$	I	$1,34 \pm 0,20$	$1,04 \pm 0,21$		

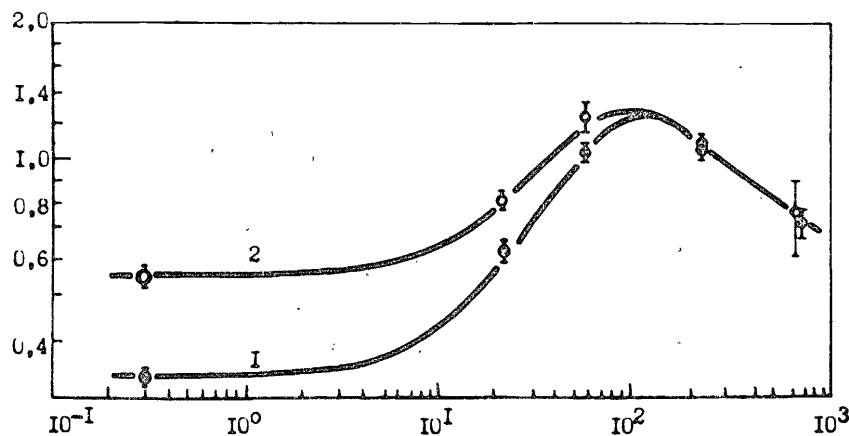


Рис.2. Зависимость радиочувствительности клеток китайского хомячка от ЛПЭ при облучении в стандартных условиях /1/ и в присутствии АраЦ + ОМ /2/. По оси абсцисс - L , кэВ/мкм; по оси ординат - D_0 , Гр⁻¹.

Исходя из этого легко объяснить повышение радиочувствительности клеток к γ -облучению в присутствии АраЦ + ОМ и отсутствие сенсибилизирующего влияния указанных агентов при действии тяжелых ионов, поскольку в последнем случае индуцируются, главным образом, ПДР ДНК. Следствием этого является наблюдаемое нами снижение коэффициентов ОБЭ тяжелых ионов в условиях влияния АраЦ + ОМ по сравнению со стандартными условиями облучения /табл.2/. В свете вышеизложенного становятся понятными причины снижения коэффициентов ОБЭ излучений с высокими значениями L у клеток с дефектами в системе репарации ДНК /20,21/.

Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что биологическая эффективность излучений с разными значениями L определяется влиянием двух факторов различной природы: физическим фактором, связанным с особенностями микрораспределения энергии излучений в генетических структурах и влияющим на выход повреждений, не репарируемых /либо трудно репарируемых/ клеткой, и биологическим - состоянием генома и эффективностью репарационных систем.

С учетом этого проведем анализ полученных нами данных с позиций модели Гюнтера - Шульца, допускающей образование при облучении лишь однотипных ДР ДНК, и в рамках разработанных нами модельных представлений, учитывающих разную природу ДР ДНК, возникающих при γ -облучении и действии тяжелых ионов. Результаты анализа приведены в следующей работе.

Авторы выражают благодарность У.Зодан за помощь при проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С.Е., Носкин Л.А., Суслов А.В. Радиобиология, 1981, т.21, вып.1, с.3.
2. Natarajan A.T., Obe G. Int.Journ.of Radiat.Biol., 1979, vol.36, No.4, p.410.
3. Амиртаев К.Г. и др. Радиобиология, 1985, т.25, вып.1, с.20.
4. Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-85-563, Дубна, 1985.
5. Козубек С., Красавин Е.А. ОИЯИ, 19-82-928, Дубна, 1982.
6. Корогодин В.И., Красавин Е.А. Радиобиология, 1982, т.22, вып.6, с.727.
7. Филатов М.В., Носкин Л.А., Коношенко Н.В. В кн.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. "Наука", М., 1983, с.213.
8. Говорун Р.Д. и др. ОИЯИ, Р19-85-718, Дубна, 1985.
9. Gunter K., Schulz W. Biophysical Theory of Radiation Action. Akad.-Verlag, Berlin, 1983.
10. Хеннигер Ю., Хорлбек Б. ОИЯИ, 10-83-366, Дубна, 1983.
11. Амиртаев К.Г. и др. Studia biophysica, 1985, vol.106, No.2, p.131.
12. Todd P. Radiation Research, 1967, suppl. No.7, p.196.
13. Todd P. Radiation Research, 1968, vol.34, No.2, p.378.
14. Skarsgard L.D. et al. Radiation Research, 1967, suppl.No.7, p.208.
15. Barendsen G.W. et al. Radiation Research, 1963, vol.18, No.1, p.106.
16. Thacker J., Stretch A., Steppens M. Int.Journ. of Radiat. Biol., 1979, vol.36, No.2, p.137.
17. Ahnstrom G., Bryant P. Int.Journ. of Radiat.Biol., 1982, vol.41, No.6, p.671.
18. Iliakis G. Radiation Research, 1980, vol.83, No.3, p.537.
19. Bertsche U., Iliakis G., Kraft G. Radiation Research, 1983, vol.95, No.1, p.57.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 июня 1986 года.